

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

DAMIR BARTOLIĆ

UTVRĐIVANJE ESTROGENOSTI UZORAKA SEDIMENTA I POVRŠINSKE VODE RIJEKE SAVE BIOTESTOM YES

Diplomski rad

Zagreb, 2011.

Ovaj diplomski rad izrađen je pod stručnim vodstvom dr. sc. Tvrtka Smitala u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju, obrada uzoraka vršena je u Laboratoriju za biogeokemiju organskih spojeva Zavoda za istraživanje mora i okoliša, Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu. Rad je dio međunarodnog istraživačkog projekta, financiranog dijelom od strane Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta RH, br. projekta 098-0982934-275 (*Ekotoksikološko značenje ABC transportnih proteina u vodenih organizama*), te dijelom od strane NATO Science for peace projekta br. SfP 982590

(Assesment of hazardous chemical contamination in the Sava River basin).

Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer ekologija.

Zahvaljujem mentoru, dr. sc. Tvrtku Smitalu na uloženom trudu, pruženoj mogućnosti izrade diplomskog rada i na savjetima, korekcijama, podršci i pomoći tijekom pisanja diplomskog rada.

Veliku zahvalnost želim izraziti i dr. sc. Branki Pivčević na praktičnim metodama rada i priprema u laboratoriju, kao i njenoj smirenosti, stručnosti i pristupačnosti.

Na potpori, pomoći, tonama skripti i bilješki, te na jednom od najboljeg vremena mog života zahvaljujem Vedranu, Tvrtku, Jeleni, Dariju, Luciji, Martini, Sunčici, Olji, Petri, Marini, Dubravki, Antoniji, Željki i nećakinji Jeleni.

Hvala i svim profesorima PMF-a, od kojih bih posebno izdvojio pokojnog doc. dr. dc. Srećka Jelenića, što su svih ovih godina učinili studij zanimljivim. Zahvaljujem im na pristupačnosti, njihovom velikom trudu uloženom u predavanja, praktičnoj nastavi i vodstvu na terenima.

Na kraju, želim zahvaliti svojim roditeljima, Mariji i Damiru, na potpori, razumjevanju i strpljenju, bez vas ništa od ovog ne bi bilo moguće.

Hvala Vam svima!

Damir Bartolić

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

UTVRĐIVANJE ESTROGENOSTI UZORAKA SEDIMENTA I POVRŠINSKE VODE RIJEKE SAVE BIOTESTOM YES

Damir Bartolić

Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Područje rijeke Save značajno je zbog svoje guste naseljenosti i izvora pitke vode za milijune ljudi, te je njena zaštita od velikog gospodarskog i ekološkog interesa. U sklopu projekta NATO SfP pod nazivom *Assessment of Hazardous chemical contamination in the Sava River basin*, proveden je suvremen pristup procjene rizika onečišćenja rijeke Save, tzv. EDA (eng. – *Effects Directed Analysis*). EDA – pristup, za razliku od uobičajenih kemijskih analiza, pruža svrsishodniji fokus na pojedine grupe zagađivala koristeći rezultate bioloških testova. Kao test utvrđivanja estrogenog potencijala u okolišnim uzorcima rijeke Save, korišten je biotest YES (eng. – *yeast estrogen screen*) zbog pouzdane mogućnosti utvrđivanja estrogenosti. Testni organizam je modificiran soj pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji induciran estrogenom eksprimira enzimsku aktivnost β -galaktozidaze. Rezultati analize površinske vode i sedimenta rijeke Save biotestom YES ukazali su na umjereno zagađenje ksenoestrogenima, s nešto povišenim vrijednostima nizvodno od Zagreba, Siska i Jasenovca, dok razlog za zabrinutost pokazuju visoke vrijednosti dobivene za uzorak otpadne vode primarnog ispusta uređaja za preradu otpadnih voda grada Zagreba, ponovo ukazujući na nužnost prerade otpadnih voda.

(52 stranica, 15 slika, 8 tablica, 30 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici Prirodoslovno matematičkog fakulteta, Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Ključne riječi: test YES, ekotoksikologija, biotest, estrogeni potencijal, ksenoestrogen, Sava, europska rijeka

Mentor: Dr. sc. Tvrtko Smital, viši znanstveni suradnik

Ocjenjivači: Dr. sc. Tvrtko Smital, viši znanstveni suradnik
Prof. dr. sc. Goran Igor Vinko Klobučar
Prof. dr. sc. Zoran Tadić
Prof. dr. sc. Mirna Ćurković-Perica

Zamjena: Prof. dr. sc. Mladen Kerovec

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

ASSESSMENT OF ESTROGENIC POTENTIAL IN SEDIMENT AND FREE WATER SAMPLES OF THE RIVER SAVA USING YEAST ESTROGEN SCREEN

Damir Bartolić

Faculty of Science, Department of Biology, Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Due to its drinking water reservoirs and dense population the River Sava basin represents the area of economic and environmental interest. Establishing a system for scientifically based protection, monitoring and risk assessment, a state of the art approach called the Effects Directed Analysis (EDA) was applied in this study. EDA combines results of the advanced chemical analysis and bioassays to identify the most critical categories of pollutants. In order to make assessment of estrogenic potential of the surface and sediment samples from the Sava River, the Yeast Estrogen Screen (YES) was used due to its simplicity, sensitivity and reliability. The test organism was a strain of genetically modified yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, which expresses enzyme activity of β -galactosidase when induced by estrogens. Results indicated moderately elevated pollution by xenoestrogens downstream from Zagreb, Sisak and Jasenovac. As expected, results obtained by testing the primary effluent samples from the Zagreb city sewage treatment plant revealed high content of xenoestrogens, justifying an advanced waste water treatment of highly polluted waste waters of the Zagreb city.

(52 pages, 15 figures, 8 tables, 30 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library

Key words: YES screen, xenoestrogen, monitoring, estrogen potential, ecotoxicology, Sava, Sava River, European river

Supervisor: Tvrtko Smital PhD, Higher Research Associate

Reviewers: Tvrtko Smital PhD, Higher Research Associate
Prof. dr. sc. Goran Igor Vinko Klobučar
Prof. dr. sc. Zoran Tadić
Prof. dr. sc. Mirna Ćurković-Perica

Replacement: Prof. dr. sc. Mladen Kerovec

Thesis accepted:

Sadržaj:

1.	UVOD.....	1
1.1.	Znanost za mir.....	1
1.1.1.	Područje istraživanja	2
1.1.2.	Rijeka Sava	4
1.2.	Modulatori endokrinog sustava.....	5
1.2.1.	Theodora E. Colborn – pionir u istraživanju endokrinih učinaka okolišnih zagađivala.....	5
1.2.2.	Endokrini modulatori i mehanizam djelovanja estrogena / ksenoestrogena.....	7
1.3.	Tipovi biotestova za procjenu estrogenosti.....	12
1.3.1.	Biotest YES	15
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	17
3.	MATERIJALI I METODE	18
a.	Uzorkovanje i obrada uzoraka vode i sedimenta.....	18
i.	Lokaliteti uzorkovanja	18
ii.	Uzorkovanje	19
iii.	Priprema i obrada uzoraka.....	20
a.	Biotest YES / Testni organizam	25
i.	Kemijski reagensi	25
ii.	Tehnička oprema i laboratorijska oprema	26
iii.	Izrada hranjivih medija.....	27
iv.	Uzgoj i pohrana kvasca.....	30
v.	Izvođenje biotesta YES	32
iv.	Izračun estradiolskih ekvivalenata	37
4.	REZULTATI	38
a.	Obrada izmjerenih vrijednosti apsorbancije.....	39
b.	EC50 vrijednosti	41
c.	Izračunati estradiolski ekvivalenti (E2Eq)	41
5.	RASPRAVA	46
6.	ZAKLJUČAK	49
7.	LITERATURA	50

1. UVOD

1.1. Znanost za mir

Od 2002. god. traje uspješna međunarodna znanstvenoistraživačka suradnja između znanstvenika Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta „Ruđer Bošković“ (IRB) i Norveškog instituta za istraživanje voda (*Norsk institutt for vaanforskning* – nor., NIVA). Instituti sudjeluju u projektima na području ekološke procjene rizika i ublažavanja posljedica od opasnog kemijskog onečišćenja. Istraživanja su vezana uz vodene i morske ekosustave. Pod pokroviteljstvom NATO-ovog programa „*Science for Peace*“ („Znanost za mir“, SFP), čiji je cilj regionalna i međunarodna suradnja na područjima civilne znanosti i tehnološkog napretka, nastavljena je međunarodna suradnja hrvatskih i norveških znanstvenika na projektu pod nazivom *Assessment of hazardous chemical contamination in the Sava River basin* (<http://www.irb.hr/nato-savariver/index.html>).

Svijest o važnosti rijeke Save dovela je do nekoliko međunarodnih inicijativa s ciljem transgranične suradnje, dijaloga, održivog upravljanja i njene zaštite (*Sava River Basin Initiative* i *International Sava River Basin Commission*). Ostvarenje tih inicijativa ovisi i o procjeni kemijske kontaminacije, razvitku sustava monitoringa i identifikacije višestrukih onečišćivača. Ti ciljevi se vežu na ciljeve ovog projekta i ostvarit će se razradom i primjenom modernog pristupa, tzv. EDA (eng. *effect-directed analysis*) posebno prilagođenog rijeci Savi u laboratorijima IRB-a i NIVA-e. Usporedne kemijske analize i biotestovi daju pouzdaniju informaciju te bržu analizu i identifikaciju najznačajnijih onečišćivača. Glavni ciljevi projekta mogu se svesti na:

- odabir kritičnih lokacija na rijeci Savi između slovenske i bosanske granice te tipa uzoraka koji će se sakupljati (otpadna voda, riječna voda, riječni sediment)
- modernizaciju postojeće analitičke opreme laboratorija koji sudjeluju u projektu i razvitak novih ili optimiziranje postojećih kemijskih i bioloških metoda potrebnih za EDA
- identificiranje najznačajnijih kategorija štetnih organskih zagađivala u bazenu rijeke Save
- razvoj pouzdanih EDA protokola za identifikaciju štetnih zagađivala u površinskoj, otpadnoj vodi i sedimentu bazena rijeke Save

- prijenos stručnog znanja u primjeni EDA usavršavanjem i obrazovanjem mladih hrvatskih znanstvenika s IRB-a u NIVA-i
- širenje znanja i iskustava usvojenih tijekom trajanja projekta svim potencijalnim korisnicima u Hrvatskoj i susjednim zemljama kroz godišnje sastanke i radionice, nakon završetka projekta.

1.1.1. Područje istraživanja

Područje istraživanja obuhvaća zapadni dio hrvatskog dijela rijeke Save, gotovo uz Slovensku granicu, pa sve do područja Jasenovca, gdje Sava počinje graničiti s Bosnom i Hercegovinom. Važno je napomenuti da je to najveći riječni sliv u jugoistočnoj Europi koji obuhvaća otprilike 97 713 km² s ukupnim brojem stanovnika na području sliva rijeke Save od oko 8 176 000, odnosno udjelom od 46% stanovnika zemalja koje obuhvaća (Sažetak analize sliva rijeke Save, ISRBC). Samo u Republici Hrvatskoj, na prostoru uz tok rijeke Save živi oko 50% građana, tj. oko 2 300 000 stanovnika. Posavina je naziv za područje uz rijeku Savu koje obuhvaća teritorije četiri države: Sloveniju, Hrvatsku, Bosnu i Hercegovinu i Srbiju. Tamo se nalaze neki od najvećih gradova u regiji što za posljedicu ima relativno gustu naseljenost, odnosno industrijsku i poljoprivrednu proizvodnju (Slika 1.). Sve navedene zemlje spadaju u tzv. tranzicijske zemlje koje u smislu zaštite okoliša imaju loše industrijsko i gospodarsko naslijeđe, te nedostatnim mjerama nadzora i zaštite prirodnog bogatstva.

Navedeno područje odabrano je za ovo istraživanje zbog nužnosti standardizacije metoda nadzora koji bi bili specifični za čitav tok Save, stoga je bilo važno odabrati mjesta za koja se opravdano sumnja da doprinose zagađenju, primjerice područja uz grad Zagreb i Sisak. Grad Zagreb glavni je grad Republike Hrvatske, a Sava je plovna tek od Siska, stoga je transport potencijalno opasnog tereta lociran na područja istočnije od Siska. Od 1980.-tih godina uslijed gospodarskog pada bivše SFRJ, pa preko 1990.-tih i rata na prostoru bivše SFRJ dolazi do značajnog pada prometa rijekom Savom koji se održao sve do danas. Iako je nakon rata uspostavljen prometni put rijekom od Siska do Beograda, nije bilo značajnog rasta prometa u odnosu na prethodna razdoblja, što daje dobru podlogu za izradu sustava kvalitetnog plana nadzora i upravljanja (Milković, 2010).



Slika 1. Područje bazena rijeke Save oko grada Siska karakterizirano gustom naseljenosti i intenzivnom poljoprivredom (preuzeto s Google Maps).

Situaciju tijekom 1990.-tih godina treba staviti u kontekst; neki dijelovi toka rijeke Save bili su poprište ratnih zbivanja, te se može pretpostaviti da u njoj ima zaostalih neeksplodiranih ubojitih sredstava, dok je s druge strane moguće i onečišćenje tla, površina i podzemnih voda uslijed razaranja industrijskih i vojnih postrojenja sa za sada nepoznatim tipovima zagađivala. To treba imati na umu kod izrade metoda nadgledanja i identifikacije, kako bi one obuhvatile i tu potencijalnu vrstu štetnog utjecaja u rijeci Savi.

Važno je napomenuti da je čitavo područje rijeke Save, izuzev pojedinih mjesta oko većih gradova (Zagreb, Županja) podložno poplavama i sadrži nizinske retencije poput Lonjskog i Mokrog polja, Kupčine, Zelenike i Jantaka. To su područja bitna mjesta biološke raznolikosti i predstavljaju zaštićene rezervate za divlje ptice i druge životinje (Crna Mlaka, Obedska Bara i Lonjsko polje su tzv. Ramsarska područja).

1.1.2. Rijeka Sava

Čitavo slivno područje rijeke Save klimatski se može podijeliti u tri tipa:

- Alpska klima koja obuhvaća gornji tok u planinskom dijelu Slovenije
- Umjerena kontinentalna klima njenih desnih pritoka
- Umjerena kontinentalna klima srednje Europe i njenih lijevih pritoka iz područja panonskog bazena

Na najvećem području ipak prevladava umjerena kontinentalna klima čija su obilježja oštra hladna zima sa snježnim padalinama i dugo toplo ljeto. U najhladnijem mjesecu, siječnju, prosječna temperatura iznosi oko -1.5°C , a u najtoplijem srpnju, prosječna temperatura dostiže 20°C . Prosječna godišnja količina padalina iznosi oko 1100 mm, s prosječnom godišnjom evaporacijom od 530mm. Količina oborina pada od zapada prema istoku (Sažetak analize sliva rijeke Save, ISRBC).

Od svojeg izvora na zapadu prema ušću s Dunavom, topografija reljefa se izrazito mijenja, od planinskih i brdskih (2864 m kod Triglava u Slovenskim Alpama) prema nizinskim dijelovima toka prema panonskom bazenu (71 m nadmorske visine kod Beograda). Upravo je taj nizinski dio mjesto intenzivne poljoprivredne proizvodnje i meliorativnih zahvata.

Čitav sliv sadrži nekoliko tipova tla, a najveću površinu prekriva slabo do srednje razvijeno tlo (kambisol) zastupljeno na oko 46,4% površine sliva. Bitno je spomenuti bazično ilimerizirano tlo (luvisol) koje ovisno o strukturi može biti iznimno pogodno za poljoprivredu. Također postoje isprana i plitka tla, te fluvijalna tla koja su relativno mladog nastanka.

Sava Dolinka i Sava Bohinjka dvije su planinske rijeke čijim spajanjem nastaje rijeka Sava u blizini mjesta Radovljice u Republici Sloveniji. U bivšoj državi, Sava je bila najdulja rijeka koja je svojim čitavim tokom, maksimalne duljine (s duljim izvornim krakom Save Dolinke) od 990 km, pripadala jednoj državi. U planinskom dijelu Slovenije i gornjem toku, pa sve do granice s Hrvatskom, Sava se puni lijevim i desnim pritocima, a sam tok rijeke je relativno pravilan i usmjeren. Srednji dio toka sve više počinje meandrirati, prvenstveno uslijed geografije terena,

tipa tla i bujičnih pritoka hrvatskog i bosanskog dijela, pa se na tom dijelu nalaze i veća plavna područja. Osim što protječe kroz tri glavna europska grada, Ljubljanu, Zagreb i Beograd, ona je većim dijelom nakon Jasenovca prirodna granica između Republike Hrvatske i Bosne i Hercegovine, te se na području Novog Beograda ulijeva u Dunav.

Tok rijeke Save protječe kroz četiri države: Sloveniju, Hrvatsku, Bosnu i Hercegovinu i Srbiju. Oko 80% potreba pitke vode na području rijeke Save, podmiruje se iz podzemnih rezervoara nastalih aluvijalnim nanosima rijeke smještenih u neposrednoj blizini toka, što govori o njenom značaju i potrebi nadzora i zaštite. Stoga, u interesu je svih navedenih država uspostaviti dijalog, kvalitetan nadzor i identifikaciju mogućih tipova i lokacija onečišćivača kako bi se u slučaju potrebe moglo djelotvorno i brzo intervenirati i spriječiti potencijalno širenje onečišćenja.

1.2.Modulatori endokrinog sustava

1.2.1. Theodora E. Colborn – pionir u istraživanju endokrinih učinaka okolišnih zagađivala

Kao i Rachel Carson, koja je zaslužna za promicanje javne svijesti o očuvanju okoliša, Theodora Emily Decker Colborn (Theodora E. Colborn) (Slika 2.) može se smatrati pioninom na području podizanja svijesti o utjecaju kemijskih spojeva koji narušavaju endokrinu ravnotežu u tijelu živih bića, a nazivamo ih modulatorima endokrinog sustava.

Rođena 1927. godine na farmi u New Jerseyu, već je kao djevojčica bila oduševljena vodom, igrajući se satima uz rijeku koja je tekla uz obiteljsku farmu. Unatoč ljubavi prema prirodi, svoju prvu diplomu ostvarila je na području farmacije i to na Sveučilištu Rutgers 1947. godine. Tijekom studija upoznala je budućeg supruga s kojim se nedugo nakon studija udala i zasnovala obitelj. Nova obitelj preuzela je farmaceutske obiteljski posao, ali nakon nekog vremena zbog rastuće obitelji odlučuju se posvetiti jednostavnijem životu, stoga 1962. godine prodaju obiteljski posao i sele u Colorado gdje se uz ljekarništvo bave i uzgojem stoke. Nizina u kojoj se nalazila i njihova farma bila je bogata naslagama ugljena tako



Slika 2. Theodora Emily Decker Colborn (Theo E. Colburn).

da je 1970.-tih godina, tijekom naftne krize, naglog porasta cijene nafte i velike potražnje za fosilnim gorivima, počela eksploatacija naslaga ugljena na tom području. Masovna eksploatacija ruda i ugljena dovela je ubrzo do velikog zagađenja rijeke Gunnison's North Fork koja teče kroz to područje. Pokušavajući spasiti rijeku, Colborn ubrzo postaje aktivna, ali kao obrazovanoj osobi ubrzo joj postaje jasno da bez akademske diplome iz područja zaštite okoliša neće moći učiniti mnogo.

Stoga, u dobi od 51 godine života ponovno kreće na studij i ostvaruje diplomu iz područja slatkovodne ekologije, a nakon nekoliko godina, 1984. i doktorsku titulu iz područja zoologije. Zahvaljujući tituli i predanom radu u kongresnom uredu za zaštitu okoliša, pridružuje se projektu ekološke procjene stanja u Velikim jezerima (projekt fundacije Conservation, koja se kasnije spaja s World Wildlife Fund-om), u koja su desetljećima prije toga ispuštani razni otrovi i otpadne vode. Colborn je hipotetizirala o vezi između toksičnosti Velikih jezera i karcinomima ljudi koji žive oko jezera, no rezultati nisu ukazivali ni na kakvu povezanost. Pregledavajući na stotine stranica radova i rezultata vezanih uz Velika jezera, primijetila je znanstvene radove o životinjama koje žive uz jezera, hrane se ribom, a koje su same pokazivale znakove nedostatka hormona štitnjače u tijelu, iako drugi radovi nisu ukazivali na nedostatak joda u okolišu. Životinje nisu bile u stanju stvoriti zdravo potomstvo, velik udio tek rođenih životinja bio je bolestan ili deformiran bez obzira na naizgled zdrave roditelje. Osim toga, primijećene su promjene u aktivnosti štitne žlijezde, poremećajima ponašanja životinja i promjene u metabolizmu. Colborn je pretpostavila da moraju postojati spojevi u jezerima koji remete proizvodnju hormona i endokrinu homeostazu u tijelu tih životinja. Ranija istraživanja pokazala su da previsoka ili preniska razina hormona tijekom trudnoće dovodi do malformacija ploda ili nedovoljno izgrađenog imuniteta (dovoljno narušen imunitet da mladunče podlegne bolestima koje zdravo mladunče preboli).

Do tog trenutka nije značajnije razmatrana mogućnost postojanja zagađivala koja bi djelovala poput hormona, stoga Colborn 1991. godine organizira znanstvenu konferenciju na kojoj s drugim znanstvenicima identificira spojeve koji djeluju kao modulatori endokrinog sustava. Konferencija je pokazala da mnogi spojevi korišteni u proizvodnji plastike, pesticida,

kozmetičkih pripravaka, kućanskih potrepština i predmeta za svakodnevnu uporabu djeluju kao endokrini modulatori. Kao i kod Rachel Carson, rezultat rada Theodore Colborn naišao je na žestok otpor, kako u industrijskim krugovima, tako i u znanstvenoj zajednici. Tek su kasnija istraživanja, napredak tehnologije, te novi koncepti u znanosti o zaštiti okoliša pokazali značaj njezinog rada i potencijalnu opasnost remećenja osjetljive hormonalne ravnoteže u živim bićima koja je neophodna u stvaranju zdravog i fertilnog potomstva (Oakes 2007; Colborn T., 1996).

1.2.2. Endokrini modulatori i mehanizam djelovanja estrogena / ksenoestrogena

Svi egzogeni spojevi koji u tijelu djeluju kao inhibitori, stimulatori ili modifikatori endokrinog sustava, ili remete funkciju endokrinog sustava i razvoj organizma, nazivaju se endokrini modulatori, bez obzira bili oni prirodni ili sintetički. Za čitav spektar spojeva biljnog i životinjskog podrijetla poznato je da imaju hormonalnu aktivnost što se očituje u brojnim endokrinim abnormalnostima kod životinja i ljudi. Biljke ne pokazuju osjetljivost na takve spojeve. Također, postoje i potencijalni endokrini modulatori za koje se smatra da u kombinaciji s drugim egzogenim spojevima mogu djelovati poput hormona i izazvati endokrinu modulaciju u organizmu (IPCS, 2002) (Bolt i sur., 2001), iako se smatra da je njihov utjecaj na organizam slabiji od endogenih hormona (Nilsson, 2000). Uzimajući u obzir akumulaciju tvari kroz hranidbenu mrežu, gdje su najizloženiji vršni članovi hranidbene mreže, potrebno je posvetiti pažnju otkrivanju i kontroli ispuštanja ksenobiotika s potencijalnim hormonalnim učinkom koji nastaju ljudskom djelatnošću.

U biljnom svijetu nalazimo ih kao spojeve kojima se odvrćaju biljojedi, jedna od takvih biljaka je sladić (*Glycyrrhiza glabra*) od koje se radi slatkiš, zatim soja (*Glycine max*), hmelj (*Humulus lupulus*) i mnoge druge. Biljni endokrini modulatori nazivaju se fitoestrogeni (Wynne-Edwards K. E., 2001; De Boever i sur., 2001).

U novije vrijeme, točnije u zadnja dva desetljeća, mnogo se pozornosti pridaje antropogeno sintetiziranim spojevima za koje se utvrdilo da imaju estrogene učinak, a nazivaju se ksenoestrogeni. Brojna istraživanja *in vivo* i *in vitro* pokazala su da nekontrolirano ispuštanje endokrinih modulatora i ksenoestrogena ima direktan negativan učinak na faunu (oštećenje

endokrinog sustava, poremećaji u reprodukciji), ekosustave, pa čak i povećanje broja endokrinih poremećaja i bolesti kod ljudi (Harris i sur. 1997; Beresford i sur. 2000; IPCS, 2002).

Kao ishodišna molekula spolnih hormona uzima se molekula steroida iz koje nastaju muški i ženski spolni hormoni, odnosno androgeni i estrogeni. Kod steroidnih hormona karakteristično je što zbog svoje lipofilne prirode molekule lako prolaze kroz staničnu membranu, bez potrebe za posebnim transmembranskim proteinima, iako postoje indikacije da i za steroidne hormone postoje transmembranski nosači.

Estrogeni su ženski hormoni koji nastaju iz početne molekule zajedničke svim spolnim hormonima kod oba spola. Čitav mehanizam nastanka estrogena reguliran je spregom hipotalamus – hipofiza – jajnici. Sinteza kreće kaskadom hormona u kojem prvo mjesto zauzima gonadotropno-oslobađajući hormon (GnRH). On se stvara i otpušta iz hipotalamusa direktno u krvotok, a zatim krvotokom ulazi u prednji dio hipofize gdje stimulira stvaranje i otpuštanje dva hormona direktno u krvotok; to su folikulo-stimulirajući hormon, FSH i luteinizirajući hormon, LH. Dospjevši do jajnika stimuliraju proizvodnju estrogena u jajnicima, no oni ne nastaju direktno iz prekursora, već prolaze sintezu preko muških spolnih hormona. Stvaranje započinje u sloju stanica jajnika koji se naziva Theca Interna, iz prekursorske molekule kolesterola nastaje androstendion koji ubrzo prelazi iz Theca Interna stanica preko bazalne membrane u tzv. granulosa stanice gdje putem aromataza biva pretvoren u estron i estradiol. Alternativni put nastanka estrogena vodi također iz androstendiona koji se prevodi u testosteron, a zatim pomoću aromataze nastaje estradiol, a iz njega estron.

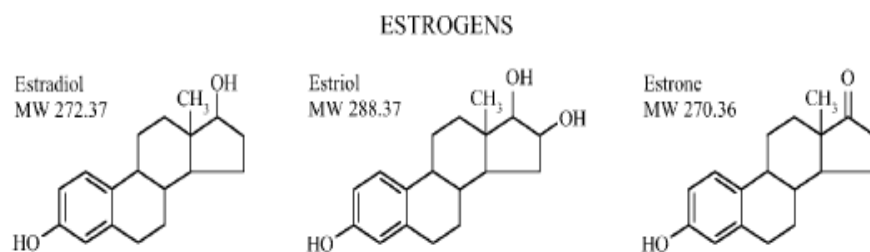
Mehanizam djelovanja bazira se na njihovoj permeabilnosti kroz staničnu membranu i vezanju na slobodne estrogenske receptore, formirajući ligand. Tako aktiviran receptor veže se u jezgri stanice za točno određenu regiju DNA koja se naziva *hormone response element* (eng., hRE) i na taj način inducira transkripciju gena. Estrogeni su zastupljeni kod oba spola, ali kod žena se nalazi u značajnije višoj koncentraciji kod kojih potiču razvitak grudi, povećavaju metabolizam i pohranu masti, stimuliraju rast endometrija i uterusa, inhibiraju resorpciju kostiju, itd. Kod muškaraca su estrogeni prisutni u znatno nižoj koncentraciji, ali njihovo prisustvo ključno je za zdravlje i sazrijevanje spermija, te regulaciju normalne razine libida.

1.2.2.1. Estrogeni i estrogenima slični spojevi (ksenoestrogeni)

Prema prirodnoj podjeli molekula koje djeluju kao spolni hormoni, moguće je napraviti podjelu u dvije velike skupine:

- Nesteroidi (ksenoestrogeni, fitoestrogeni, spojevi nastali razgradnjom surfaktanata)
- Steroidi (spolni hormoni)

Postoje tri glavna estrogena koja nalazimo kod ljudi, a to su estriol (E3), estradiol (E2) i estron (E1). Svi su steroidne strukture, što znači da im je kostur građen od tri cikloheksanska prstena (A, B, i C prsteni) i jednog ciklopentanskog prstena (D prsten) (Slika 3). Kemijski se razlikuju u skupinama na D prstenu, lipofilnosti i prostornoj konformaciji. S fiziološkog stajališta, razlika među ta tri hormona je u njihovom estrogenom potencijalu – estradiol je najjači, zatim slijedi estron, a na kraju je estriol.



Slika 3. Razlike u kemijskoj strukturi endogenih estrogena (Barceló, 2001.).

Estradiol, (17- β -estradiol), prisutan u oba spola, glavni je estrogen u tijelu s ključnom ulogom u sazrijevanju jedinki prema spolnoj zrelosti, ekspresiji sekundarnih spolnih karakteristika, regulaciji metabolizma, rastu kostiju, jetre, mozga, žila i fetusa. Estradiol u krvotoku cirkulira slobodno u iznimno malom udjelu, većinom je vezan za proteine i putuje do ciljnog tkiva gdje se otpušta s nosača u membranu stanice. Sinteza steroidnih hormona energetski je složena, a metaboliziranjem estradiola u jetri nastaju različiti konjugirani spojevi koji se izlučuju samo preko bubrega ili žuči. Energetska ušteda ostvaruje se lučenjem preko žuči, hidrolizom i reapsorpcijom estrogena u crijevu.

Lijekovi i oralna kontracepcijska sredstva dobar su primjer ksenoestrogena. Etinilestradiol (EE2) prvi je sintetski steroidni estrogen. Za razliku od estradiola, mnogo je perzistentniji u tijelu i otporniji na inaktivaciju jetrenim enzimima i među prvima se počeo koristiti kao oralni kontraceptiv. Mestranol (MeEE2) metilirana je molekula etinilestradiola, također korištena kao oralno kontracepcijsko sredstvo, kasnije zamjenjena molekulama poput levonorgestrela, noretisterona i dr.

Osim sintetskih oralnih kontraceptiva na koje ne postoje evolucijske prilagodbe organizama, postoje i prirodni ksenoestrogeni u biljnom svijetu. Po sastavu spadaju u vrlo raznoliku grupu fenolnih spojeva, flavona, flavonida, izoflavona i kumestana (derivata kumarina). Biljni ksenoestrogeni nazivaju se fitoestrogeni, a mehanizam djelovanja sličan je endogenim estrogenima; vežu se za estrogene receptore u stanici s nešto većim afinitetom prema beta tipu estrogenog receptora (ER- β) (Turner i sur., 2007). Također, reguliraju dostupnost endogenih estrogena vežući se za proteinske nosače estrogena u krvi ili stimulacijom njihove sinteze, smanjujući dostupnost prema ciljnim tkivima. Fitoestrogeni biljkama služe kao odgovor na pritisak biljojedne populacije i pomoću tih spojeva biljke je nastoje regulirati smanjujući fertilnost populacije mužjaka. Neki od tih spojeva također se koriste i kao obrana od nametnika, a pokazalo se da flavoni imaju antimikotički učinak (Leegood i Per Lea, 1998). Postoje i mikoestrogeni koji se osim u gljivama mogu naći i u nekim biljkama, npr. zearalenon.

Pojedini produkti kemijske industrije također pokazuju ksenoestrogeni učinak. Osim već spomenutih lijekova to su i različiti tipovi plastikanata, deterdženata, pesticidi, herbicidi i fungicidi, organska otapala, spojevi namijenjeni kemijskoj industriji i teški metali. Konačan broj i mehanizmi djelovanja većine ksenoestrogena nije poznat iako ih nalazimo posvuda, bilo da se radi o urbanim sredinama ili okolišu.

Bisfenol A (BPA) najpoznatiji je monomer s ksenoestrogenim učinkom koji se koristi u proizvodnji mekih prozirnih polikarbonatnih plastika i sintetskih epoksi smola. Svojim postupnim otapanjem iz plastike, pogotovo pri višim temperaturama i unosom u tijelo putem tekućina ili hrane, remeti endokrinu ravnotežu. Aerobnom razgradnjom nekih alkilfenolnih polietoksilata (kućni i industrijski surfaktanti) nastaju ksenoestrogeni spojevi poput oktilfenola i

nonilfenola, a mehanizam djelovanja zasniva se na kompetitivnoj inhibiciji estrogenog receptora (Rutishauser, 2004).

U vodenim ekosustavima teški metali poput kadmija i arsena, osim što su toksični, u nižim koncentracijama pokazuju ksenoestrogeni učinak. Nadalje, atrazin, DDT i dieldrin, samo su neki od najpoznatijih otrova korištenih u poljoprivredi kao sredstva kontrole nametnika i korova. Farmaceutski proizvodi i proizvodi za osobnu njegu sadrže aditive i spojeve s ksenoestrogenim učinkom pa ih se s opravdanjem naziva *emerging contaminants* (eng.). Njihov značaj dovoljno je pojasniti na primjeru urbanih sredina, gdje na relativno maloj površini te proizvode svakodnevno koristi velik broj ljudi, a u konačnici se ispiru u otpadne vode. Stoga, kako bi se smanjio pritisak na vodene ekosustave, od iznimnog je značaja prepoznati takve spojeve i ukloniti ih u postrojenjima za preradu otpadnih voda.

1.2.2.2. *Mehanizam djelovanja endokrinih modulatora i utjecaj na živa bića*

Odrasla, zdrava jedinka mnogo lakše podnosi teret endokrine modulacije, jer ima izgrađeno tijelo i potpuno diferencirane organe. Slabljenjem izloženosti endokrinom stresu, odrasle jedinke oporavljaju se u većoj ili manjoj mjeri od ozbiljnih ireverzibilnih posljedica po svoje zdravlje ili reproduktivnu moć (Chapman, 2006). Međutim, rani razvojni stadij organizma najosjetljiviji je period u čitavom životu, u kojem mala nepravilnost u hormonalnoj ravnoteži, djelovanje na hormonske receptore, signalne puteve ili nepravilno vezanje hormona na receptore dovodi do ireverzibilnih nepovoljnih promjena u daljnjem rastu, stagnacije razvoja ili malformacija. Neki od primjera posljedica djelovanja endokrinih modulatora u ekosistemima su feminizacija morskih puževa uslijed izlaganja tributilkositru (TBT), hermafrodizacija mužjaka riba, abnormalan razvoj ličinki riba i vodozemaca, feminizacija aligatora itd. (Guillette i sur. 1995). Učinci mogu biti trajni i vidljivi u početnim stadijima embrija, ali također mogu samo promijeniti smjer razvoja ako do izloženosti dođe prije reproduktivne zrelosti. Konačna mogućnost je da učinci izloženosti modulatorima tijekom ranih embrionalnih, fetalnih ili neonatalnih stadija razvoja ostaju prikriveni do reproduktivne zrelosti, ili se manifestiraju čak i u kasnijoj životnoj dobi.

Na životinjama se primjećuju promjene u ponašanju uzrokovane endokrinom modulacijom, a kod ljudi se one lakše identificiraju prvenstveno zbog jedinstvenog načina i potrebe za komunikacijom. Iako postoje naznake da endokrini modulatori mogu utjecati na promjene u razvoju mozga, ponašanju i poremećajima u učenju, relevantni podaci nisu dostupni (Panzica, 2011). Brojne su kontroverze oko toga jesu li endokrini modulatori odgovorni za povećanu učestalost karcinoma kod ljudi ili je to samo posljedica stila života, nezdrave prehrane, sklonosti alkoholu i cigaretama, loše kvalitete zraka u urbanim sredinama itd. (Chapman, 2006).

Imajući na umu sve navedeno, postoji nekoliko glavnih načina modulacije endokrinog sustava:

- ometanje normalnog djelovanja endokrinog sustava, kompetitivnom inhibicijom hormonalnih transportnih proteina, ili inhibicijom nekog ključnog metaboličkog puta
- kompeticija za hormonalne receptore i oponašanje endogenog hormona, što dovodi do sinergističkog djelovanja s endogenim hormonima
- nekompetitivnom inhibicijom - onemogućujući vezanje hormona na receptor ili na sličan način inhibiranjem enzimskih putova za sintezu proteina (antagonističko djelovanje)

To pokazuje da modulatori endokrinog sustava mogu djelovati indirektno na ostale metaboličke puteve, a podaci o sinergističkom djelovanju endokrinih modulatora dovode u pitanje opravdanost korištenja postojećih testova estrogenosti i njihovu sposobnost identifikacije takvih učinaka. Ipak, vjeruje se da sinergistički utjecaj endokrinih modulatora nema značajniji učinak od endogenih hormona (Nilsson, 2000; Rutishauser, 2004). Osim toga, glavni problem endokrinih modulatora jest da pri izrazito niskim koncentracijama induciraju jak fiziološki odgovor, ali učinci tog odgovora mogu ostati prikriveni dug vremenski period. Te osobine izazov su procjeni ekološkog rizika.

1.3. Tipovi biotestova za procjenu estrogenosti

Prisutnost ksenoestrogena je stvarna situacija u otpadnim vodama urbanih sredina. Potreba za nadzorom ispusta i obrade otpadnih voda u interesu je svih stanovnika. U slučaju područja

rijeke Save radi se o rezervoarima pitke vode, a u ovom i drugim slučajevima takvo praćenje (biomonitoring) opravdano je i brigom za održanje stabilnosti ekosustava. Stabilniji ekosustav u stanju je podnijeti veći šok od onog koji je pod konstantnim stresom. Urbane i industrijske sredine konstantna su prijetnja i potencijalan nagli izvor onečišćenja. U vidu toga konstantan nadzor nad stanjem u okolišu (kemijski i biološki monitoring) koji okružuje takva područja zahtjeva metodološke pristupe i alate koji će brzo i pouzdano pokazati stvarno stanje u okolišu, bez obzira radi li se o morskom, kopnenom, ekosustavu otpadnih ili površinskih voda.

Pojam biotest u užem značenju opisuje laboratorijske metode identifikacije tvari ili ekoloških parametara koji djeluju na organizme, organske sustave, organe ili stanice. U širem smislu, obuhvaća eksperimentalne i standardizirane metode određivanja vrijednosti tolerancije (ekološku valenciju) test organizama prema nekom nepovoljnom ekološkom utjecaju ili toksičnoj tvari, na temelju čega je moguće dati pravovremeno upozorenje o promjeni okoliša. Dakle, biotestovi služe za neizravni biomonitoring realnog stanja u okolišu, a svode se na izlaganje testnog organizma utjecaju testnog medija kroz određeni vremenski period ovisno o tome radi li se o akutnoj ili kroničnoj izloženosti. Nakon tog perioda promatraju se učinci medija na organizam, u ovom istraživanju mjeri se indirektni učinak endokrine modulacije i prikazuje kao doza-odgovor krivulja.

Biotestove možemo podijeliti na nekoliko načina. Primjerice, biotestovi mogu biti *in situ*, *in vivo* i *in vitro*. Ta podjela temelji se na tipu testnog organizma, vremenu koje imamo na raspolaganju za biomonitoring, financijskom planu, području koje se istražuje i krajnjim rezultatima. Druga bitnija podjela je na način izlaganja testnog organizma nekim potencijalno toksičnim spojevima, prema čemu se biotestovi dijele na statične i dinamične.

Prve hipoteze i pokušaji određivanja glavnih tipova molekula koje pridonose ksenoestrogenom učinku na ekosustave krenule su od pretpostavke da takve tvari imaju kemijsku strukturu sličnu endogenim hormonima. Nažalost, to se nije pokazalo točnim pa problematika identifikacije tih molekula zahtjeva razvitak kvalitetnih bioloških i analitičkih metoda. Biotestovi *in situ/in vivo* imaju prednost u tome što daju uvid u utjecaj toksikanata na točno određen tip organizma ili organski sustav, tkiva i stanice zajedno s metaboličkim sustavima eliminacije tog toksikanta.

Mane su dug vremenski period, potreba aklimacije testne životinje, transport, žrtvovanje, održavanje u laboratoriju, moguće ih je uglavnom primijeniti na vodene ekosustave, ne daju uvijek realnu sliku stanja ukoliko se radi o zreloj jedinci, a upitno je i vrijeme izlaganja. Biotestovi koji se vrše na glodavcima omogućuju modifikaciju na razne načine, izlaganje toksikantima kroz niz generacija i praćenje potencijalne nasljedne abnormalnosti.

In vitro biotestovi su relativno jeftini, s niskim troškovima održavanja, mogućnost ponavljanja i brzim dobivanjem rezultata. Međutim, takvi biotestovi uglavnom ne omogućavaju metaboliziranje testiranih spojeva, pa stoga ne pružaju uvid u sudbinu toksikanta unutar organizama. Najčešće se koriste za preliminarna istraživanja i identifikaciju glavnih tipova zagađivala te kao smjernice za složenija istraživanja. U *in vitro* biotestovima možemo koristiti animalne stanice i stanice kvasca, niže beskralježnjake, ljudske stanice itd.

Za istraživanje ksenoestrogenosti razvijeno je nekoliko *in vivo* i *in vitro* biotestova:

- VTG test, podrazumjeva mjerenje vitalogenina iz krvi riba induciranog estrogenima
- E-Screen (stanice raka dojke osjetljive na estrogen), u prisutnosti estrogena stanična kultura MCF-7 prolifera pa se iz tog svojstva procjenjuje estrogenost neke tvari (Harris i sur., 1997; Miksicek, 1993)
- trodnevni uterotrofni test (eng. *3-day uterotrophic assay*), mjeri se težina i svojstva uterusa glodavaca nakon izlaganja estrogenoj tvari u odnosu na kontrolu (Laws i sur., 1999)
- Yeast estrogen screen (YES), test estrogenosti kvascem
- Zona radiata proteini, hepatociti pastrve osjetljivi na estrogen stvaraju te proteine
- RTG-2 test (eng. *rainbow trout gonad cell line*, stanična linija gonada kalifornijske pastrve) pokazao se kao visoko osjetljiv biotest prema estrogenim spojevima (Rutishauser, 2004)

Svaki od ovih biotestova ima svoje prednosti i mane, no treba izdvojiti YES i RTG2. Test estrogenosti kvascem procjenjuje estrogenost jednako dobro kao i svi ostali navedeni testovi, a glavna prednost je jednostavnost izvedbe i niska cijena. Zamjerka mu je to što u kombinaciji s nonilfenoksikarboksilatom i (vjerojatno) oktilfenoksiacetatom, zbog konformacijskih promjena estrogenog receptora, daje lažno negativan rezultat, a ne sadrži niti metaboličke puteve biotransformacije koje imaju viši organizmi (Routledge i Sumpter, 1996; Rutishauser, 2004). RTG-2 test pokazao se kao iznimno prijemljiv prema ksenoestrogenima, no zbog relativno kompleksnog izvođenja i pripreme stanicama i održavanje staničnih linija u sterilnim uvjetima, nije prvi izbor.

1.3.1. Biotest YES

Nakon što je Colborn sa suradnicima 90.-tih godina prošlog stoljeća podigla znanstveno pitanje ksenoestrogenosti, u fokus dolazi problematika standardnih testova koji daju relevantne podatke o stanju tih spojeva u okolišu. Istraživački dio Glaxo grupe razvio je soj kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) transfeciran ljudskim genom za estrogeni receptor u kvaščevoj jezgri i ekspresijskim plazmidom u citoplazmi s regijom odgovora na estrogen koji regulira dio laktoznog operona, točnije kodiranje enzima β -galaktozidaze. Routledge i Sumpter nazivaju ga test estrogenosti kvascem (eng. *Yeast Estrogen Screen*, YES) i 1996. godine iznose rezultate dobivene korištenjem YES i demonstriraju robusnost, jednostavnost i relevantnost dobivenih podataka u svrhu evaluacije estrogenog potencijala pojedinačnih spojeva i okolišnih uzoraka. Također su izneseni zabilježeni slučajevi davanja lažno negativnih rezultata u prisutnosti oktilfenoksiacetata i nonilfenoksiacetata i nemogućnost zamjene *in vivo* testom zbog nedostatka metaboličkih puteva biotransofrmacije.

Kad YES test koristimo u procjeni ksenoestrogenosti nekog uzorka i posebno modificiran soj kvasca izložimo djelovanju nekog ksenoestrogena, nakon prolaska u citoplazmu oni se vežu za estrogene receptorske proteine (ER) i formiraju ligand s velikim afinitetom vezanja na ERE mjesto ekspresijskog plazmida, otvarajući na taj način put transkripciji gena za enzim β -galaktozidazu. Potencijal vezanja za ER direktna je procjena estrogenog potencijala nekog uzorka, no mora postojati mogućnost mjerenja tog vezanja. Stoga je ekspresija β -galaktozidaze direktna mjera potencijala nekog ksenoestrogena, no mjerenje koncentracije tog enzima

iznimno je složen proces i nije praktičan. Kao mjeru koncentracije enzima bilo je jednostavije iskoristiti njegovu aktivnost, s obzirom da se izlučuje iz stanica kvasca u medij. Dodavanjem žutog spoja klorfenol-crveno- β -D-galaktopiranozid (CPRG), β -galaktozidaza cijepa glikozidnu vezu između galaktoze i klor-fenol-crvenog što dovodi do crvenog obojenja medija koje se mjeri spektrofotometrijski (Routledge i Sumpter, 1996; Harris i sur., 1997). Imajući u vidu sve navedeno, uputno je rezultate dobivene YES biotestom tumačiti prije svega preliminarno i prema potrebi pozitivne rezultate naknadno potvrditi nekim drugim biotestom za procjenu estrogenosti.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Procjena estrogenog potencijala sedimenta i površinske vode rijeke Save korištenjem YES testa krajnji je cilj ovog dijela istraživanja, kao dijela NATO projekta Procjena kontaminacije štetnim spojevima u bazenu rijeke Save, financiranog unutar programa „*Science for peace*“ –. Sukladno potrebama i smjernicama glavnog projekta, rezultati ovog rada imaju kao jedan od krajnjih ciljeva širenje znanja o laboratorijskom radu korištenjem ekotoksikološkog testa za procjenu estrogenosti, metodi istraživačkog rada, korištenju znanstvene literature, povezivanju kemijskih i bioloških koncepata i izradi valjane procjene rizika ispravnim prikazom rezultata dobivenih laboratorijskim biotestom. Glavna hipoteza kreće od pretpostavke da najveći doprinos potencijalnom ksenoestrogenom onečišćenju dolazi iz urbanih sredina Zagreba i Siska, uz očekivano visok ksenoestrogeni odgovor iz uzoraka sirove otpadne vode (prije tretiranja) uređaja za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba. Kao referentnu postaju za usporedbu pri tome uzimamo lokaciju Otok Samoborski, smještenu 10-tak km uzvodno od grada Zagreba.

3. MATERIJALI I METODE

a. Uzorkovanje i obrada uzoraka vode i sedimenta

i. Lokaliteti uzorkovanja

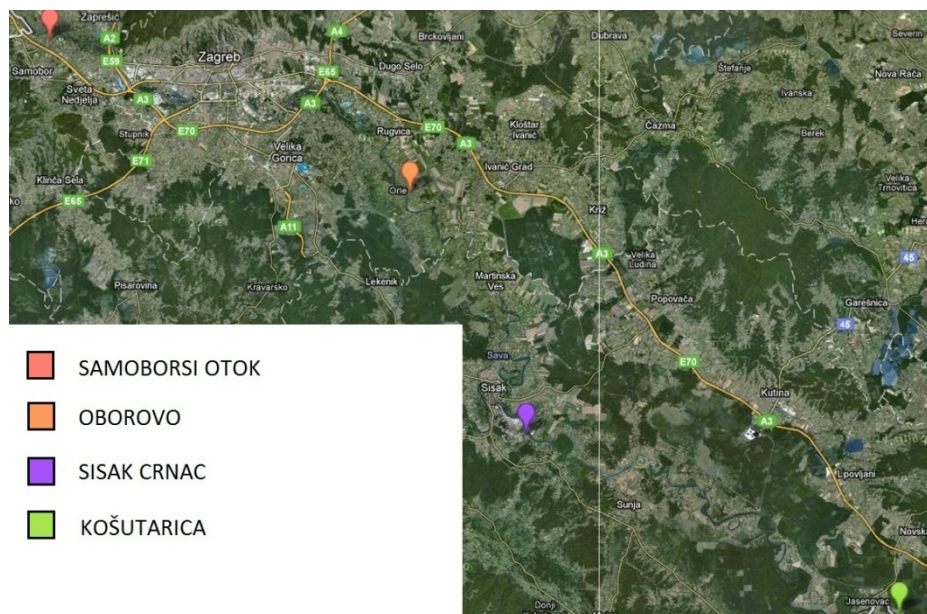
Prije sakupljanja uzoraka bitno je odrediti reprezentativne točke, odnosno lokacije koje će dati vjerodostojne rezultate za temeljitu izradu protokola Analize usmjerene učincima (eng. *Effect Directed Analysis* – EDA). U uzorkovanje je bitno uključiti mjesta koja su gusto naseljena i najviše pridonose ispustu otpadnih gradskih i industrijskih voda. Uzorci sedimenta i površinske vode sa svih lokaliteta uzimali su se u vrijeme najnižih vodostaja kako bi predstavljali najgore moguće scenarije pritiska otpadnih voda na ekosustav i rijeku Savu. Na tom području nalazi se glavni grad Zagreb, a odmah nakon njega nekada snažan industrijski grad Sisak, koji je ujedno i najsjevernija teretna luka. U vidu toga izabrane su lokacije unutar 150 km toka rijeke Save u neposrednoj blizini Zagreba, pa sve do područja grada Jasenovca uz granicu Bosne i Hercegovine, nakon ušća rijeke Une u Savu. Dva su glavna razloga odabira baš tog dijela rijeke Save kao mjesta uzorkovanja:

- gusto naseljena i industrijski opterećena područja Zagreba i Siska u kojima živi oko milijun stanovnika, s raznolikim spektrom kemijskih zagađivala
- dobro definiran gradijent onečišćenja, od nisko do srednje onečišćenih područja prije grada Zagreba, pa sve do područja nizvodno od Zagreba i Siska koje pokazuju znatno veći ispust otpadnih voda

U skladu s tim razlozima odabrana su četiri lokaliteta (Slika 4.) s kojih su se sakupljali uzorci sedimenta i površinske vode rijeke Save, a to su:

- Otok Samoborski, služi nam kao referentna postaja, udaljena 10-ak km uzvodno od Zagreba, u blizini slovenske granice (potencijalna postaja za usporedbu prekograničnog onečišćenja)
- Oborovo, 15 km nizvodno od gradskog odvoda kanalizacije grada Zagreba i 5 km nizvodno od glavnog ispusta kanalizacije Velike Gorice

- Crnac, 2 km nizvodno od grada Siska (50 000 stanovnika, proizvodnja pesticida, rafinerija za preradu nafte i željezara)
- Košutarica, nedaleko od Jasenovca, 50-ak km nizvodno od grada Siska, neposredno nakon ušća rijeke Une iz Bosne i Hercegovine u rijeku Savu



Slika 4. Lokacije uzorkovanja površinske vode i sedimenta (preuzeto s Google Maps).

Uz navedene uzorke, također će biti sakupljeni kompozitni (24-satni) uzorci vode ispusta grada Zagreba u postrojenju za preradu otpadnih voda.

ii. Uzorkovanje

U uvodu su navedeni glavni razlozi odabira postaja uzorkovanja sedimenta i površinske vode rijeke Save (Tablica 1.). Prvo sakupljanje uzoraka provedeno je 3. lipnja 2008. godine, a volumeni vode iznosili su 25 litara, te su uz njih skupljeni su i manji uzorci sedimenta (Tablica 2.). Voda je prikupljena uranjanjem staklenih boca (demižona) volumena od 25 litara na dubinu od 30 – 50 cm direktno u rijeku Savu.

Uz navedene, 2. srpnja 2008. sakupljene su smjese uzoraka primarnog i sekundarnog ispusta iz tada tek otvorenog uređaja za obradu otpadnih voda grada Zagreba (ZOV). Prikupljanje je izvršeno pomoću automatskih sakupljača, a uzorak je sadržavao jednodnevni uzorak primarnog (PE) i sekundarnog (SE) ispusta otpadnih voda.

Tablica 1. Popis lokacija, oznake i volumeni sakupljenih uzoraka površinske i otpadne vode.

Lokacija	Otok Samoborski	Oborovo	Sisak Crnac	Košutarica	Primarni ispušt otpadnih voda	Sekundarni ispušt otpadnih voda	Otok Samoborski preliminarni uzorak	Kontrola (200 ml MeOH)
OZNAKA	OS1	OB	SC	KŠ	ZPE	ZSE	OS2	BL
VOLUMEN/L	25	25	25	25	3.06	10.85	22	-

Tablica 2. Popis lokacija, oznake i mase sakupljenih uzoraka sedimenta.

Lokacija	Otok Samoborski	Oborovo	Sisak Crnac	Košutarica	Kontrola (kvarcni pijesak) 1	Kontrola (kvarcni pijesak) 2
OZNAKA	S-OS	S-OB	S-SC	S-KŠ	S-BL1	S-BL2
MASA/g	74.40	72.41	56.24	50.16	50	50

iii. Priprema i obrada uzoraka

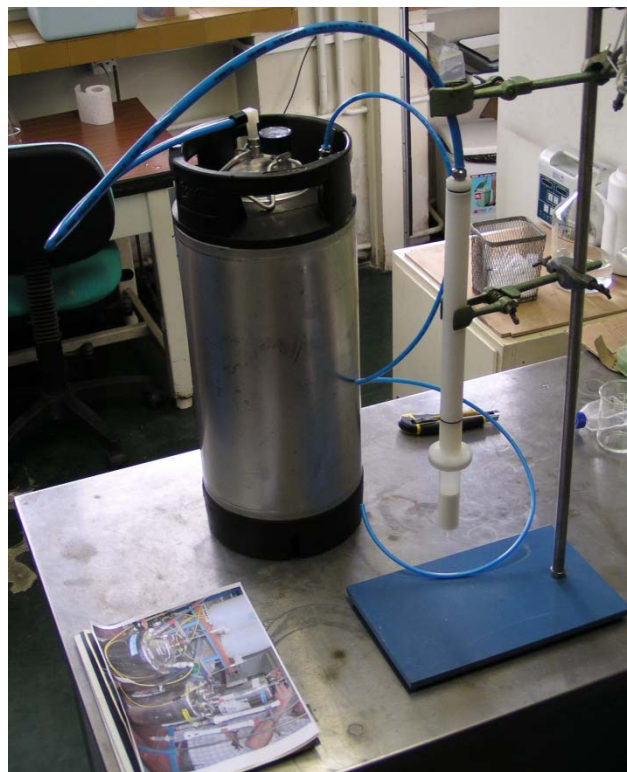
1. Obrada uzoraka površinske vode

Svi prikupljeni uzorci obrađeni dolaskom u laboratorij, smještanjem u hladnjak na temperaturu od 4 – 8°C, te obrađivani po redu u sljedeća dva dana ovisno o tipu uzorka.

Uzorci površinske vode prebačeni su u tzv. LVE uređaj za ekstrakciju velikih volumena (eng. – LVE – *large volume extraction*) (Slika 5.). Zapravo se radi o modificiranoj čeličnoj bačvi za bezalkoholna pića koja zaprima čitav volumen uzorka s pojedine lokacije. LVE se koristi zbog mogućnosti regulacije brzine protjecanja uzoraka površinske vode preko posebnih kolona ispunjenih stacionarnom fazom visokopolimerizirane smole Oasis koja na sebe veže lipofilne spojeve. Regulacija istjecanja vrši se regulacijom pritiska dušika preko reduktivnog ventila iz visokotlačne boce. Prije propuštanja preko kolone uzorci isprva nisu bili filtrirani, a nakon istjecanja čitavog volumena uzorka, kolona je prvo osušena u struji dušika, a zatim eluirana s volumenom od 200 ml metanola (MeOH). Metanol ispire hidrofilnije molekule. Problem začepjenja Oasis kolone dogodio se prilikom obrade uzoraka Otok Samoborski i Oborovo, stoga je bilo potrebno modificirati protjecanje i iskoristiti dvije potpuno nove Oasis kolone.

Bilo je očekivano da će uzorci primarnog i sekundarnog ispusta uređaja za obradu otpadnih voda grada Zagreba biti opterećeni tvarima koje bi mogle začepiti Oasis kolonu, slično kao što se dogodilo s uzorcima OS1 i OB. Da bi se to izbjeglo, napravljena je predkolona ispunjena staklenom vunom nakon koje slijedi Oasis kolona.

Eluati svedeni na volumene od 200 – 500 ml (ovisno o gustoći) dalje su uparivani u struji dušika rotacijskim uparivačem (200 mbar pri 45°C) i reducirani na cca 30 ml te razdijeljeni na dva dijela za potrebe kemijskih i bioloških analiza. Tako su dobiveni uzorci volumena između 15 i 18 ml, a uz navedene uzorke provedeno je i uparivanje slijepe probe od 200 ml MeOH kako bi se otklonila mogućnost kontaminiranja uzoraka otapalom koje može pokazivati estrogene učinak.



Slika 5. Spremnik LVE spojen na predkolonu punjenu staklenom vunom i Oasis kolonom.

2. Obrada uzoraka sedimenta

Za razliku od uzoraka površinske vode, gdje su neki uzorci morali biti ohlađeni i čekati na red kako bi bili obrađeni, uzorci sedimenta odmah su stavljeni u plastične plitice i sušeni u digestoru. Osušeni sediment bilo je potrebno samljati ahatnim mlinom kako bi se dobio fini prah i povećala kontaktna površina s otapalom. U ASE uređaju za ubrzanu ekstrakciju otapalom (ASE – eng. *Accelerated Solvent Extraction*) uzorci se ispiru s dva otapala, MeOH i diklormetanom (DCM). Za razliku od površinske vode u kojoj većinom prevladavaju hidrofilne molekule, u sedimentu mogu zaostajati lipofilnije molekule koje ispiru DCM. Kako cilindri za ASE nisu bili dovoljno veliki da u njih stane čitav sadržaj sedimenta jedne lokacije, ekstrakcija se vršila po dva puta za svako otapalo što je rezultiralo s 4 eluata za svaki uzorak. Nakon toga,

eluati s DCM-om spojeni su i upareni zasebno na volumen od 1-2 ml da se izbjegne mogući gubitak hlapivih lipofilnih molekula prilikom spajanja s eluatima MeOH-a. Nakon što su eluati DCM-a upareni, prebačeni su u djelomično uparene odgovarajuće eluate MeOH-a. Pri uparivanju na volumen od 30-tak ml, uzorci su ponovno podijeljeni na dva približno jednaka dijela, volumena između 15 i 16 ml, za kemijske i biološke analize.

Tako dobivene eluate prebacujemo u epruvete i stavljamo u uređaj za uparivanje strujom dušika, Turbo Vap LV, s vodenom kupelji na 40°C. Uzorci su upareni do mikrolitarskih volumena.

3. Naknadna obrada uzoraka vode

Prije uparivanja u struji dušika, ekstrakti su filtrirani preko žarenog (bezvodnog) Na_2SO_4 kako bi se uklonio talog, čestice i voda. Dobivene uzorke prebacili smo u epruvete i zatim stavili u uređaj Turbo Vap LV na uparivanje. Vodena kupelji u uređaju namještena je na 40°C, a uzorci su upareni na mikrolitarske volumene. Suhi uzorak potrebno je otopiti u dimetilsulfoksidu (DMSO), pri čemu treba voditi računa o toksičnosti. Kvasac podnosi maksimalnu koncentraciju DMSO-a od 2%, dok animalne stanice podnose maksimalno 1% DMSO-a. S tim u vidu dodaje se što manji volumen u skladu s volumenom uzoraka iz okoliša, te se izračunaju ekvivalentni volumeni DMSO-a. Primjer izračuna za uzorak otpadne vode (ZOV):

$$V(\text{DMSO}_{\text{zov}}) = \frac{V(\text{DMSO}_{\text{uz}}) \times V_{\text{zov}}}{V_{\text{uz}}}$$

$$V(\text{DMSO}_{\text{zov se}}) = \frac{0,5[\text{ml}] \times 10085[\text{ml}]}{25000[\text{ml}]} = 0,217[\text{ml}] = 217[\mu\text{l}]$$

$$V(\text{DMSO}_{\text{zov pe}}) = \frac{0,5[\text{ml}] \times 3060[\text{ml}]}{25000[\text{ml}]} = 0,0612[\text{ml}] = 61,2[\mu\text{l}]$$

Tablica 3. Polazišni volumeni uzoraka, odnosno konačne volumne koncentracije uzoraka prevedenih u DMSO i spremnih za ispitivanje biološkim analizama.

LOKACIJA	Otok Samoborski	Oborovo	Sisak Crnac	Košutarica	Primarni ispušt otpadnih voda	Sekundarni ispušt otpadnih voda	Otok Samoborski preliminarni uzorak	Kontrola (200 ml MeOH)
OZNAKA	OS1	OB	SC	KŠ	ZPE	ZSE	OS2	BL
VOLUMEN VODE/l	25	25	25	25	3.06	10.85	22	-
VOLUMEN ZA BIOLOŠKA ISTRAŽIVANJA	12.5	12.5	12.5	12.5	1.53	5.43	12.5	-
DODANO DMSO (μl)	500	500	500	500	200	709	500	500
NETO VOLUMEN DMSO (μl)	490	487	495	487	185	700	490	490
VOLUMEN VODE ml / 1 μl uzorka	25	25	25	25	7.65	7.65	25	-

Volumen od 61.2 μl iznimno je nepovoljan za potrebe ovog rada jer gubitci pri mikrolitarskim volumenima mogu biti značajni. Imajući u vidu koncentriranost uzoraka iz uređaja za obradu otpadnih voda grada Zagreba (ZOV) u odnosu na ostale uzorke, veće razrjeđivanje uzoraka iz kolektora od onih iz okoliša neće imati utjecaj na rezultate testa. U uzorke ZOV potrebno je dodati onaj volumen DMSO s kojim se može rukovati i izbjeći mogući nedostatak za potpuno provođenje biotesta. Stoga smo u ZOV-PE dodali dodatnu količinu DMSO-a kako bi konačan volumen iznosio 200 μl, a korekcijom to znači da u ZOV-SE dodajemo volumen DMSO-a kako bi dobili 709 μl (Tablica 3.). Sve uzorke u epruveti s dodanim DMSO-om miješamo na orbitalnom mješaču (vorteksu) kako bi se čitav volumen sa stijenki oborio u DMSO. Nakon toga se čitavi volumeni pomoću jednokanalne pipete prebacuju u čiste staklene bočice s čepom i bilježi se neto volumen pojedinog uzorka imajući u vidu gubitak uzorka prilikom prebacivanja od 10-20%.

4. Naknadna obrada uzoraka sedimenta

Kao i za vodu, uzorci sedimenta nisu jednake mase pa je nužno korigirati volumen DMSO-a i dobiti jednake ekvivalente. Veći volumen DMSO-a potrebno je dodati jer sediment sadrži lipofilnije spojeve koji brže zasićuju otapalo. Sukladno tome oni uzorci veće mase zahtijevali su i veći volumen DMSO-a. Korekcija volumena vršena dodavanjem DMSO-a kod uzoraka iz Košutarice i lokacije Sisak Crnac (Tablica 4.). Primjer izračuna za uzorak sedimenta (S-SC):

$$V(DMSO_{s-kš}) = \frac{V(DMSO_{s-ref}) \times m_{s-kš}}{m_{s-ref}}$$

$$V(DMSO_{s-sc}) = \frac{900[\mu l] \times 56[g]}{73[g]} = 690[\mu l]$$

$$V(DMSO_{s-kš}) = \frac{900[\mu l] \times 50[g]}{73[g]} = 616[\mu l]$$

Tablica 4. Polazišne mase uzoraka, odnosno konačne masene koncentracije uzoraka prevedenih u DMSO i spremnih za ispitivanje biološkim analizama.

LOKACIJA	Otok Samoborski	Oborovo	Sisak Crnac	Košutarica	Kontrola 1 (kvarcni pijesak)	Kontrola 2 (kvarcni pijesak)
OZNAKA	S-OS1	S-OB	S-SC	S-KŠ	S-BL1	S-BL2
MASA (g)	74.40	72.41	56.24	50.16	50	50
MASA ZA BIOLOŠKA ISTRAŽIVANJA (g)	37.2	36.205	28.12	25.08	25	25
DODANO DMSO (μl)	900	900	690	616	900	900
NETO VOLUMEN DMSO (μl)	890	890	680	610	890	890
MASA SEDIMENTA mg / 1 μl uzorka	41.33	40.23	40.75	40.71	28	28

a. Biotest YES / Testni organizam

i. Kemijski reagensi

17β-estradiol (E2);

adenin;

amonijev sulfat;

bakar (II)-sulfat - bezvodni;

D-(+)- glukoza;

d-biotin;

D-pantotenska kiselina;

glicerol;

inozitol;

kalijev fosfat – monobazični bezvodni;

kalijev hidroksid;

L-arginin - hidroklorid;

L-aspartična kiselina;

L-fenilalanin;

L-glutaminska kiselina;

L-histidin;

L-izoleucin;

L-leucin;

L-lizin – monohidroklorid;

L-metionin;

L-serin;

L-tirozin;

L-treonin;

L-valin;

magnezijev-sulfat – anhidrirajući;

piridoksin;

tiamin – hidroklorid;

željezo (III) sulfat – pentahidrat;

Gore navedene kemikalije kupljene su od tvrtke Sigma/Aldrich (St. Louis, MO, SAD)

aldesol – Pliva, Zagreb, Hrvatska;

dimetil – sulfoksid (DMSO) – Kemika, Zagreb, Hrvatska;

klorfenol-crveni- β -D-galaktopiranozid (CPRG) –Boehringer Mannheim, Mannheim, Njemačka

deionizirana voda MiliQ, IRB, Zagreb.

ii. Tehnička oprema i laboratorijska oprema

analitička vaga;

autoklav za sterilizaciju plastičnih nastavaka i otopina;

centrifuga – Hettich Zentrifugen, Njemačka;

jednokanalne i 8-kanalne mikropipete – Eppendorf, Njemačka;

kabinet za rad u sterilnim uvjetima – Heraeus Instruments, Njemačka;

magnetska miješalica;

orbitalna drmalica na 28 °C;

plastične epruvete i plastično posuđe;

plastične mikroploče, 96 jamica, ravnog dna – TPP, Trasadingen, Švicarska;

spektrofotofluorometar za mikroploče – Tecan, Švicarska;

sterilni čepovi, aluminijska folija, vata, gaza;

sterilni nastavci, pipete, stakleno posuđe;

suhi sterilizator za sterilizaciju staklenog posuđa;

sušionik;

termo drmalica za mikroploče na 32 °C – Biosan, SAD;

termostat;

vodena kupelj na 37 °C – Sutjeska.

iii. Izrada hranjivih medija

Prije pripreme otopina i medija za uzgoj kvasca i izvođenje YES-a, potrebno je sav pribor i posuđe isprati dva puta apsolutnim etanolom kako bi se uklonila moguća kontaminacija nekim estrogenim spojem. Osim toga, posuđe od polikarbonatne plastike autoklaviranjem ispušta endokrine modulatore, koji zatim daju povišenu ili lažnu pozadinsku ekspresiju. Takve predmete i posuđe bolje je sterilizirati kemijski. U slučaju da nemamo apsolutni etanol, ispiranje pribora i posuđa može se vršiti dvostrukim ispiranjem metanolom i jednom etanolom.

Mediji za uzgoj kvasca izrazito su nutritivni i time vrlo podložni kontaminaciji, stoga se pripreme i izvođenje YES-a izvode u aseptičnim uvjetima. Protokol za izradu YES-a na uzorcima ovog rada dobiven je od dr. P. Sumptera s Brunel University (Uxbridge, Middlesex, Engleska). Osnovni medij koji se koristi u YES-a naziva se minimalni medij (eng. – *minimal medium*), a iz njega se dalje izvode medij za rast (eng. – *growth medium*) i testni medij (eng. – *assay medium*).

Sastav minimalnog medija:

Sastojci	Količina
KH_2PO_4	13.61 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.98 g
KOH (s)	4.20 g
MgSO_4	0.20 g
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ otopina (40 mg/50 ml H_2O)	1 ml
L-leucin	50 mg
L-histidin	50 mg
adenin	50 mg
L-arginin-HCl	20 mg
L-metionin	20 mg
L-tirozin	30 mg
L-izoleucin	30 mg
L-lizin-HCl	30 mg
L fenilalanin	25 mg
L-glutaminska kiselina	100 mg
L-valin	150 mg
L-serin	375 mg
MiliQ H_2O	1000 ml

Izvagane sastojke i magneti  za miješanje dodaje se u bocu na magnetnoj miješalici s grija em na 40 C. Nakon otapanja svih sastojaka miješanjem i grijanjem, otopina se dalje sterilizira u autoklavu na 121 C 20 minuta.

U najvećem dijelu volumena medija za rast i testnog medija sadrŹan je minimalni medij. Dodavanjem pet dodatnih otopina u minimalni medij dobiva se medij za rast, a dodavanjem CPRG-a u medij za rast dobivamo testni medij. Otopine se izrađuju na sljedeći način:

- D-(+)-glukoza

Pripremljena je 20% vodena otopina glukoze, podijeljena u alikvote od 20 ml i autoklavirana na 121°C 20 minuta. Nakon sterilizacije, čuvati na sobnoj temperaturi.

- L-aspartat

Napravljena je otopinu masene koncentracije od 4mg/ml, podijeljena u alikvote od 20 ml i autoklavirana na 121°C 10 minuta.

- Otopina vitamina

Dodano je 8 mg tiamina, 8 mg piridoksina, 8 mg pantotenske kiseline, 40 mg inozitola i 20 ml otopine biotina (2 mg u 100 ml vode) u 180 ml MiliQ ili dvostruko destilirane vode. Otopina je termolabilna, stoga se sterilizacija vršila u sterilnom kabinetu (laminaru) filtriranjem preko jednokratnog filtera pora veličine 0.2 µm u 10 ml sterilnu bočicu. Pohraniti na 4°C.

- L-treonin

Bilo je potrebno prirediti otopinu masene koncentracije od 4 mg/ml. Nije termolabilna i autoklavira se na 121°C 10 minuta u 10 ml alikvotima. Pohraniti na 4°C .

- Bakar(II)-sulfat

Potrebno je prirediti 20 mM otopinu, filtrirati u aseptičnim uvjetima u laminaru preko jednokratnog filtera pora 0.2 µm, u sterilne bočice po 5 ml i pohraniti na sobnu temperaturu. Bakar(II)-sulfat eliminira sve stanice kvasca koje ne sadrže transformirani plazmid.

- Klorfenol-crveni-β-D-galaktopiranozid (CPRG)

Pripremljena je otopina od 10 mg/ml, sterilizirana u laminaru kroz jednokratni filter pora veličine 0.2 µm u sterilnu bočicu. Otopina je foto – osjetljiva pa bočicu omatamo u aluminijsku foliju i pohranjujemo na temperaturi od -15 do -25°C.

iv. Uzgoj i pohrana kvasca

Soj kvasca dvostruko transformiran s ekspresijskim plazmidom YEpE12 s cjeloukupnim hER i reporterskim plazmidom YrpE2 (β -gal cDNA) dobiven je 1998. godine od dr. Jungbauera (Sveučilište za prirodne i primjenjene znanosti (BOKU), Beč). Od tada se kultivira i koristi u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju. Kvasac se pohranjuje ovisno o periodu korištenja, pa postoji kratkotrajna i dugotrajna pohrana.

Dugotrajna pohrana podrazumjeva smrzavanje kvasca u tekućem dušiku pomoću krioprezervativa glicerola, onemogućavajući formiranje intracelularnih kristala i oštećenje finih staničnih struktura. Treba voditi računa da pri odmrzavanju kvasca iz tekućeg dušika glicerol djeluje toksično. Da se to izbjegne, odmah nakon vađenja iz kriostata, kvasac se obara u centrifugi i glicerolni supernatant se baca. Drugi način je naglo odmrzavanje u vodenoj kupelji na 37°C kako bi se izbjeglo dugotrajno izlaganje glicerolu tijekom odmrzavanja, te je odmah naciepljen u prethodno pripremljen medij za rast (GM). Nakon 24 – 48 satnog rasta, zatim se mjeri turbiditet, stanice se obaraju i koncentriraju, pa se jednim dijelom pohranjuju na (-20°C) ili (-80°C), a dijelom koriste za YES. Bitno je naglasiti se da priprema medija, otopina, koraci vezani uz naciepljivanje za pohranu, odlijevanje supernatanta, resuspenzije i izvođenje testa YES mora raditi u sterilnim uvjetima.

- Dugotrajno pohranjivanje (-80°C)

Da bi kvasac mogao preživjeti zamrzavanje potrebno ga je prethodno uzgojiti kroz 3 dana na polutvrdom koso izlivenom agaru. Za 1% agar, potrebno je dodati 1 g bakteriološkog agara u 90 ml minimalnog medija (MM). Pripremljena otopina se autoklavira i ohladi do temperature od 50°C kako bi bile dodane otopine za GM; 2.5 ml aspartata, 0.8 ml treonina, 1 ml otopine vitamina, 250 μ l bakar(II)-sulfata i 10 ml glukoze. Još topla otopina ulijeva se u sterilne epruvete pod kutem od 45°C, kako bi se medij stisnuo i stvorio koso podlogu. Na koso podlogu bakteriološkom ušicom naciepi se kvasac direktno iz dugotrajne ili kratkotrajne pohrane i inkubira 3 dana na 32°C. Slijedi resuspenzija uzgojenog kvasca u 100%-tnom sterilnom glicerolu pomoću sterilne ušice, prebacivanje u sterilne kribočice u alikvotima od 0.5 ml i dugotrajna pohrana na (-80°C).

- Kratkotrajno pohranjivanje (-20°C)

Kratkotrajno pohranjivanje također se izvodi u 3 dana, no na drugačiji način od dugotrajnog pohranjivanja. Sav postupak izvodi se u laminaru:

Prvi dan

Selektivni GM priređuje se prema standardnom protokolu. U sterilnu Erlenmeyerovu tikvicu (tikvica) volumena između 250 – 300 ml dodaje se sterilnim staklenom pipetom 45 ml MM-a, i jednokanalnom mikropipetom

5 ml glukoze, 1.25 ml aspartata, 0.4 ml treonina, 0.5 ml vitaminske otopine, 125 µl bakar(II)-sulfata i 250 µl kvasca iz dugotrajne pohrane s -80°C. Ako koristimo 10X koncentrirani kvasac iz kratkotrajne pohrane s (-20°C), dodajemo 125 µl kvasca. Tikvica se začepi sterilnim bakteriološkim čepom, načinjenim od gaze i vate i inkubira u vodenoj kupelji s drmalicom na 28°C 24 sata, ili dok ne postigne željeni turbiditet (Slika 6.). U našem slučaju, GM je nacijepljen kvascem iz dugotrajne pohrane, stoga je trebalo tri dana do optičke gustoće 1.00.



Slika 6. Vodena kupelj s drmalicom za uzgoj kvasca.

Drugi dan

U dvije sterilne tikvice priređeno je po 52 ml GM-a, a svakoj tikvici dodano je po 1 ml 24-satne kulture kvasca iz prvog dana. Tikvice su začepljene bakteriološkim čepom i inkubirane sljedećih 24 sata u vodenoj kupelji s drmalicom na 28°C.

Treći dan

Nakon 24 sata, tikvice su izvađene iz inkubacije i sadržaj u laminaru preličen u sterilne 50 ml epruvete za centrifugiranje, koje su zatim stavljene u centrifugu na 2000 x g 10 minuta, pri temperaturi od 4°C. Supernatant se odlije i na dnu ostaje oboreni kvasac, koji za kratkotrajnu

pohranu resuspendiramo u 5 ml MM s 15% glicerolom (8 ml sterilnog glicerola dodajemo u 45 ml MM). Na taj način dobije se 10X koncentrirana kultura kvasca koja je dalje razdijeljena u 1.2 ml kriobočice s po 0.5 ml po bočici i pohranjena na (-20°C). Rok trajanja kratkotrajne pohrane je 4 mjeseca.

v. Izvođenje biotesta YES

Izvođenje YES-a obavljalo se u sterilnom kabinet, s odgovarajućom laboratorijskom odjećom, dezinficiranim lateks rukavicama, a stopalni dio obuće šprican je aldesolom par minuta neposredno prije ulaska u prostoriju s laminarima.

- Dan 0 - priprema za biotest YES

Prema gore navedenom protokolu, pripremljen je selektivni GM kvasca u koji dodajemo jednokanalnom mikropipetom 200 µl kvasca s -20°C, kojem je prethodno centrifugiranjem odstranjen glicerol. Inokulirani GM inkubira se 24 sata do optičke gustoće (OD) 1.00.

- Dan 1

Nakon 24 sata potrebno je izmjeriti turbiditet kulture kvasca. U slučaju da je optička gustoća značajno manja od 1, u laminaru lagano protresemo tikvicu iz inkubacije kako bi resuspendirali stanice. Jednokanalnom mikropipetom prenesemo 200 µl kvasca u dvije jamice prazne sterilne mikroploče (Slika 7.) i izmjerimo apsorbancu spektrofotometrom. Izmjerena optička gustoća naraslog kvasca „preko noći“ iznosila je OD = 0.6, stoga je sav sadržaj centrifugiran, odlivena je polovica supernatanta, a ostatak je resuspendiran. Nakon toga, preostali volumen je oko 25 ml optičke gustoće OD = 0.96 što je dovoljan turbiditet za korištenje u YES-u.

Za izradu YES-a na 6 uzoraka sedimenta potrebne su 3 mikroploče, a za 8 uzoraka površinske vode potrebno je 4. Svaka mikroploča ima 8 redova i 12 kolona, tj. 96 jamica u koje stane 200 µl uzorka, što iznosi oko 20 ml po pločici. Nadalje, potrebno je testirati standard, modelni estrogen 17β-estradiol (E2) kao pozitivnu kontrolu i testirati otapalo DMSO kao negativnu kontrolu. Pozitivna i negativna kontrola rade se za obje serije uzoraka (sediment i površinska voda), pa su potrebne još dvije mikroploče. U konačnici to iznosi 9 mikroploča. Odlučeno je da će se posao

pripreme mikroploča razdijeliti na dva dana, jedan za izradu testa na uzorcima sedimenta, a drugi za izradu testa na uzorcima površinske vode.

Razlozi su bili tehničke prirode, prvenstveno nedostatak adekvatnog čistog posuđa za tako velik volumen testnog medija, nedovoljan broj čistih tipseva za multikanalnu pipetu (Slika 7.), veličina orbitalne miješalice za mikroploče u koju stane samo 4 mikroploče, te ograničeni prostor u laminaru. Iz tog razloga prvo se pristupilo izradi mikroploča za uzorke sedimenta i pozitivne i negativne kontrole. Za tu svrhu utrošeno je 4 mikroploče za koje je pripremljeno malo više od 80 ml testnog medija. Nadalje, iz osnovne 10 mM otopine estradiola načinjeno je 500 nM otopina E2 dovoljna za sve uzorke iz rijeke Save, te konačno pripravljen selektivni GM naciepljen kvascem za test na uzorcima vode sljedećeg dana.

Prema protokolu za izradu testnog medija potrebno je prvo izraditi GM u duplikatu, jer je taj volumen dovoljan za 4 mikroploče. Od ukupno 104 ml načinjenog GM-a potrebno je načiniti 3% otopinu GM s kvascem, stoga se odlilo 7 ml GM-a i dodaje 3 ml resuspendirane 24-satne kulture kvasca optičke gustoće približno 1. Iz te 3% otopine kvasca u GM-u, odlilo se narednih 20.8 ml i dobilo se 79.2 ml otopine GM-a i kvasca. U taj volumen dodaje se 0.8 ml otopine CPRG, tako da je konačan rezultat 80 ml testnog medija.

Izrada serijskog razrjeđenja na pločicama u sterilnim uvjetima za 4 mikroploče:

a) Za uzorke sedimenta rijeke Save i kontrolne uzorke

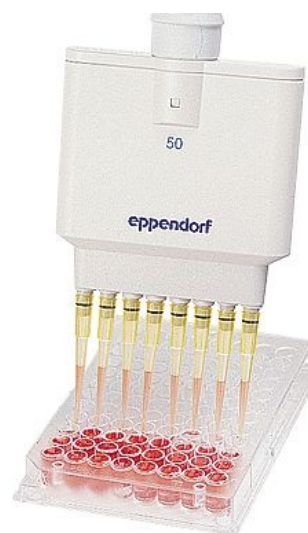
Bitno je napomenuti da se rubne kolone i redovi jamica na mikropločama ne koriste kao relevantne zbog pojave tzv. rubnog efekta (jače evaporacije jamica bliže rubu). Imali smo 4 uzorka sedimenta iz rijeke Save i još dvije kontrole kvarcnog pijeska, što daje ukupno šest uzoraka. Oduzmu li se od 8 redova jamica, dvije rubne, ostaje 6 slobodnih redova po 10 kolona jamica (jer dvije rubne kolone također nisu relevantne), što je 60 jamica po mikroploči u kojima je moguće testirati uzorke. Dogovoreno je da svaki pojedini uzorak sedimenta bude testiran u triplicatu, što znači da svaki uzorak zauzima 3 reda na pločici, odnosno svaka mikroploča testira dva različita uzorka sedimenta.

Testni medij izlije se u sterilnu kadnicu, koja mora biti dovoljno široka za multikanalnu mikropipetu. Na prvoj mikroploči, u kolonu 2 dodaje se 294 μ l testnog medija, a u ostale 54 preostale jamice dodaje se 200 μ l testnog medija. Jednokanalnom mikropipetom dodaje se 6 μ l uzorka sedimenta lokacije S-OS u prve tri jamice redova B, C i D, kolone 2, nakon zamjene tipsa dodaje se 6 μ l uzorka sedimenta lokacije S-OB u sljedeće tri jamice redova E, F i G, kolone 2. Čitava kolona 2 sada ima ukupno 300 μ l testnog medija s uzorcima (odnos 6 μ l/300 μ l), iz koje se multikanalnom mikropipetom prenosi 100 μ l iz prve kolone u drugu i tako radi serija dvostrukih razrjeđenja. Potrebno je jamice barem četiri puta resuspendirati u pojedinim kolonama da se testni medij i uzorci dobro promiješaju. Razrjeđenja se vrše do kolone 10, nakon resuspenzije uzima se 100 μ l iz kolone 10 i samo se ispusti u kolonu 12 koja je ionako rubna. Kolona 11 služi kao slijepa proba i to na sljedeći način; u redove B, C i D kolone 11 stavlja se 1 μ l čistog DMSO, a redovi E, F i G kolone 11 ne dodajemo DMSO. Nakon toga, uzimaju se

čisti tipsevi na multikanalnu mikropipetu i dodaje 100 μ l testnog medija u jamice kolone 12 gdje je odloženo 100 μ l iz kolone 10, a sve ostale rubne jamice dopune se s 200 μ l testnog medija ili sterilizirane vode, kako unutarne jamice ne bi gubile volumen evaporacijom.

Druga mikroploča izvodi se potpuno identično kao i prva, samo što u B, C i D redove kolone 2 dodajemo 6 μ l uzorka lokacije S-SC, a u redove E, F i G kolone 2 dodajemo uzorke lokacije S-KŠ.

Treća mikroploča također se izvodi potpuno identično kao i prva, samo što je ovdje prvi uzorak kontrola, tj. S-BL1, a kao drugi uzorak je S-BL2.



Slika 7. *Primjer upotrebe multikanalne mikropipete.*

b) Za estradiol (E2) i dimetilsulfoksid (DMSO)

Testiranje E2 kao standarda i pozitivnu kontrolu ima za cilj pružiti relevantne podatke pomoću kojih će se računati ekvivalenti uzoraka u odnosu na E2. Četvrta mikroploča izvodila se prema tome drugačije od ostalih tri.

Prvo je bilo potrebno iz 10 mM otopine E2 načiniti 500 nM otopinu u DMSO-u. U tu svrhu koristilo se sterilne plastične epruvetice za centrifugiranje, u prvu se dodalo 495 μ l DMSO-a i 5 μ l 10 mM otopine E2. Dobivena je 100 μ M otopina iz koje se uzima 10 μ l i miješa u 990 μ l DMSO-a. Tako je dobivena 1 μ M otopina E2, iz koje je na kraju uzeto 100 μ l E2 i pomiješano s 100 μ l DMSO-a. Na taj način dobivena je 500 nM otopina E2.

Na četvrtu mikroploču, u svih 60 relevantnih jamica dodaje se 50 μ l testnog medija, pa se u čitavu kolonu 2 dodaje još 50 μ l, tako da ukupan volumen testnog medija iznosi 100 μ l. Zatim se u redove B, C i D kolone 2 dodaje 4.1 μ l priređene 500 nM otopine E2, a u redove E, F i G kolone 2 paralelno se dodaje DMSO. Nakon toga, rade se serije dvostrukih razrjeđenja od po 50 μ l multikanalnom pipetom do kolone 10, gdje se preskače kolonu 11 koja nam ostaje slijepa proba. Sve ispuštamo u kolonu 12, a zatim dopunjujemo u sve jamice još 150 μ l pokusnog medija, a rubne jamice dopunimo do volumena od 200 μ l pokusnog medija.

Tako priređene mikroploče se poklope, flomasterom se na poklopac napišu oznake i omotaju parafilmom kako bi gubile što manji volumen medija, te se stavljaju u inkubator na 32°C preko noći.

- Dan 2

Mikroploče vadimo iz inkubatora, te ih protresemo par minuta u termo miješalici za mikroploče pri temperaturi od 32°C i nakon toga vraćamo su u inkubator. Protresanjem se poboljšava rast kvasca.

c) Za uzorke površinskih i otpadnih voda

Kultura kvasca „preko noći“ izvađena je iz vodene kupelji i prema već opisanom protokolu prilagođen je turbiditet ukoliko je potrebno na $OD = 1$. Pripremio se testni medij za 5 mikroploča prema opisanom standardnom protokolu, od kojih su četiri mikroploče bile za osam uzorka vode i jedna mikroploča za pozitivnu kontrolu E2 i DMSO-a.

Uzorci su dodavani u triplikatima, po 6 μ l, jednako kao i uzorci sedimenta, tako da u jamicama kolone svih mikroploča prije izrade serije dvostrukih razrjeđenja ima 300 μ l testnog medija s uzorkom. U kolonu 11 ne radi se dvostruko razrjeđenje, već se u gornji triplikat (redovi B, C i D) dodaje 1 μ l DMSO-a. Jedina iznimka u radu bili su uzorci iz primarnog ispusta uređaja za obradu otpadnih voda (ZPE), koji su radi malog prikupljenog volumena i iznimno velike koncentriranosti dodavani u triplikat po 3 μ l umjesto 6 μ l, pa je u tu svrhu i konačan volumen u početnim jamicama tog triplikata namješten na po 300 μ l. Daljnji tijek izrade mikroploče bio je identičan do sad opisanom.

Na kraju je izrađena i mikroploča s pozitivnom kontrolom E2 i negativnom kontrolom DMSO. Tijek izrade identičan je izradi kontrolne mikroploče onome prvog dana.

Nakon izrade svih 5 mikroploča, rubovi su obmotani parafilmom, pravilno su označene i prebačene u inkubator na 32°C.

Dan 3 i 4

Svih 9 mikroploča protrese se par minuta u termo miješalici za mikroploče na 32°C, kako bi se poboljšao rast kvasca, a zatim su vraćene u inkubator na 32°C.

Dan 4

Iz inkubatora je izvađeno svih 9 mikroploča, četiri mikroploče s uzorcima vode i pripadajuće kontrolne ploče protresene su par minuta u miješalici i zatim vraćene u inkubator na 32°C. Četiri ploče s uzorcima sedimenta (inkubirane su tri dana) također su protresene u miješalici i ostavljene sat vremena na sobnoj temperaturi kako bi se kvasac slegao. Zatim se pristupilo

mjerenju apsorbancije klorfenol-crvenog (CPR) proizvedenog djelovanjem eksprimiranog gena za β -galaktozidazu ksenoestrogenim spojevima i E2. Apsorbancija se mjerila u čitaču mikroploča pri valnim duljinama od 540 nm za CPR i 620 nm za mjeru gustoće kvasca.

Dan 5

Nakon inkubacije od tri dana, svih pet mikroploča vadi se i stavlja u termo mješač na 32°C par minuta. Zatim se stave na sobnu temperaturu sat vremena i nakon toga pristupa se mjerenju apsorbancije u čitaču mikroploča na 540 nm za CPR i 620 nm za turbiditet kvasca.

iv. Izračun estradiolskih ekvivalenata

Rezultate apsorbancije bilo je potrebno normirati prema formuli:

$$\text{Normirana vrijednost} = \text{Uzorak}_{540\text{nm}} - (\text{uzorak}_{620\text{nm}} - \text{slijepa proba}_{620\text{nm}})$$

Normalizirane vrijednosti apsorbancije, log transformirane koncentracije, te razrjeđenja uzoraka omogućuju stvaranje doza–odgovor krivulja. Krivulje dovode u ovisnost ekspresiju i aktivnost β -galaktozidaze, inducirane uzorcima i E2, odnosno prevode podatke apsorbancije u mjeru učinka. Krivulja dobivena iz podataka apsorbancije kontrolnih mikroploča arbitrarno se uzima kao 100%-tna mjera učinka, na osnovi toga računa se EC50 koncentracija E2 standarda. Ona se izražava u pg E2/jamici.

Za uzorke, EC50 je onaj volumen (ml), tj. masa (g) uzorka koja izaziva 50% učinka od najviše dobivenog standardom E2. On se računa tako da se 50% odgovor uzorka nanese na standardnu E2 krivulju, te se očita koncentracija. Određivanje koncentracije ksenoestrogena u pojedinom uzorku računa se po formuli:

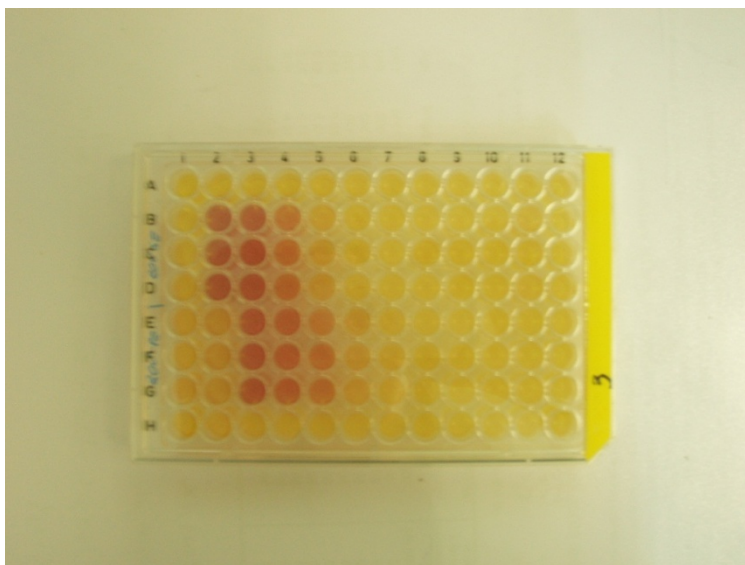
$$\text{E2Eq} = \frac{\text{EC50}_{\text{E2}}}{\text{EC50}_{\text{Uzorak}}} \times 1000$$

Dobivena koncentracija izražava se u ekvivalentima modelnog estrogena (E2Eq), za uzorke vode u ng/L, a za sediment u ng/g.

4. REZULTATI

Ekspresijom enzima u testnom mediju dolazi do katalitičkog cijepanja CPRG-a na CPR i galaktozu. Testni medij isprva žute boje postaje crven, a ta boja se može mjeriti spektrofotometrijski na valnoj duljini od 540 nm.

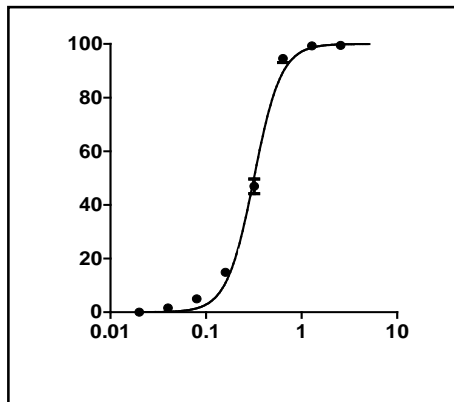
Izmjerene apsorbancije čitačem mikroploča ukazuju da je došlo do ekspresije enzima β -galaktozidaze, odnosno ukazuju da je transformirani kvasac bio induciran ksenoestrogenima na svim lokalitetima, izuzev slijepih probi i kontrola. Najjači odgovor dao je najrazrjeđeniji uzorak vode iz primarnog ispusta uređaja za obradu otpadnih voda kojem je estradiolski ekvivalent gotovo tri puta veći od onog iz sekundarnog ispusta, te oko dvadeset puta veći od referentne postaje OS (Tablice 5. i 6.). Uzorci OB, SC i KŠ imaju podjednako visoke estrogene ekvivalente vode i sedimenta. Zanimljivost je zamijećena kod uzorka ZPE u prvoj koloni (kolona 2) gdje smo nanijeli po početnih 3 μ l uzorka, već vizualno (što je potvrdila i apsorbancija za tu kolonu) nakon inkubacije nije bilo vidljive ekspresije β -galaktozidaze, no već u sljedećoj koloni eksprimirana je aktivnost enzima (Slika 8.)



Slika 8. Mikroploča s uzorkom ZPE (primarni ispust otpadnih voda) u koloni 2 (2:E,F,G).

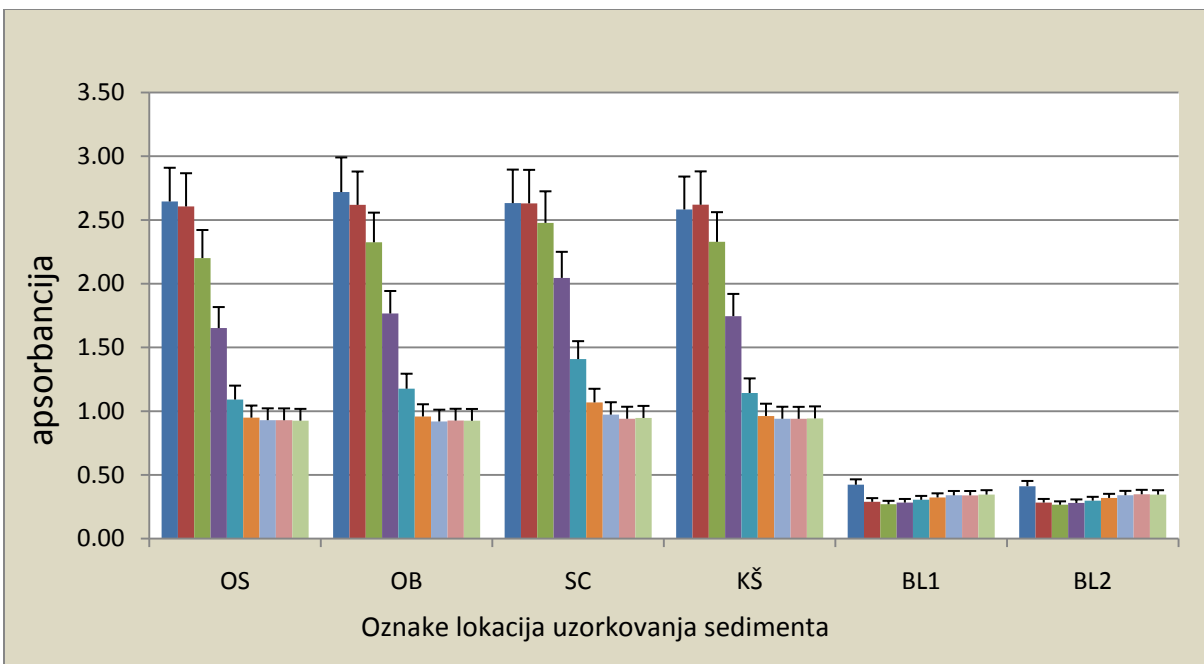
a. Obrada izmjerenih vrijednosti apsorbancije

Najvažniji izvor podataka koji možemo dobiti obradom rezultata apsorbancije je sigmoidalna doza – odgovor krivulja estradiola. To je standardna krivulja E2 iz koje se dobije vrijednost EC50 kao mjera koncentracije u nM (Slika 9.). Prije izrade standardne krivulje E2, sve podatke potrebno je normirati, normalizirati i log-transformirati po postupku opisanom u poglavlju Materijali i metode.

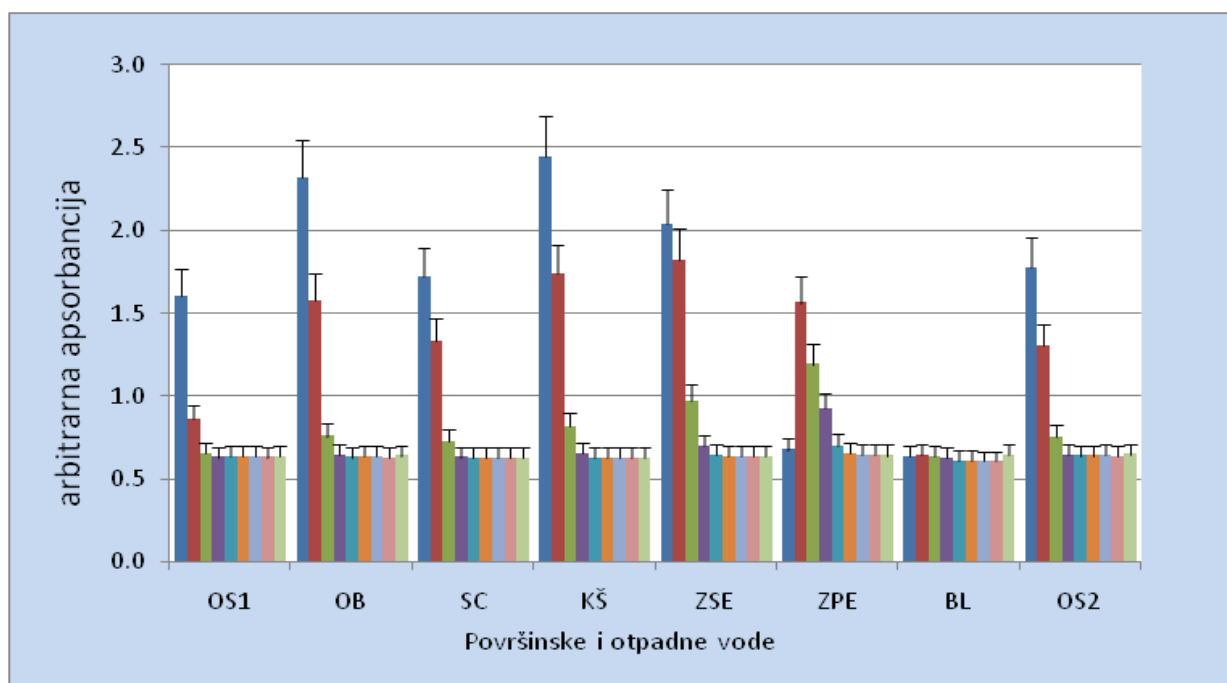


Slika 9. Sigmoidalna standardna E2 krivulja najrelevantniji je podatak u radu. Krivulja prikazuje ovisnost koncentracije estradiola (E2) u nM o normaliziranim vrijednostima apsorbancije u postotku maksimalnog odgovora (% from max response).

Normiranjem podataka otklanja se turbiditet iz podataka o apsorbanciji CPR-a. Uspravne kolone u grafovima su srednje vrijednosti svakog pojedinog razrjeđenja u jamicama. Kontrole nam služe kako bi ustanovili da li je postojala pozadinska kontaminacija putem opreme korištene u pripremi, obradi i pohrani uzorka. Normirane vrijednosti računaju se tako da se od vrijednosti svih apsorbancija turbiditeta oduzme vrijednost slijepe probe. Dobivene vrijednosti za svaki triplikrat razrjeđenja, oduzimamo od vrijednosti apsorbancije mjerene na 540 nm za CPR (Slika 11.; Slika 12). Uz to računata je standardna devijacija i prikazana je zajedno s normiranim podacima.



Slika 10. Srednje vrijednosti triplikata uzoraka sedimenta za svaku jamicu sa standardnom devijacijom (OS – Otok Samoborski, OB – Oborovo, SC – Sisak Crnac, KŠ – Košutarica, BL1 i BL2 su kontrole)



Slika 11. Srednje vrijednosti triplikata uzoraka vode za svaku jamicu sa standardnom devijacijom. (OS1– Otok Samoborski, OB – Oborovo, SC – Sisak Crnac, KŠ – Košutarica, ZSE- sekundarni ispust, ZPE – primarni ispust, BL – kontrola, OS2 – preliminarni uzorak Otok Samoborski)

b. EC50 vrijednosti

Korištenjem statističkog programa GraphPadPrism, normiranim podacima apsorbancije i log-transformiranih koncentracija i serija razrjeđenja, konstruirane su sigmoidalne doza – odgovor krivulje (Slika 9.). Krivulja opisuje aktivnost β -galaktozidaze, odnosno estrogensku aktivnost uzoraka. U obzir se uzima samo linearni dio krivulje. Sposobnost uzoraka da uzrokuje 50%-tni učinak E2 (što se naziva EC50 vrijednost; eng. – *half maximal effective concentration*) opisuje se kao odgovor uzorka (Tablica 5.; Tablica 6.).

Tablica 5. Vrijednosti EC50 za uzorke sedimenta iz sigmoidalne standardne krivulje E2.

LOKACIJA	OZNAKA	EC50
Otok Samoborski	S-OS	39.08
Oborovo	S-OB	34.69
Sisak Crnac	S-SC	35.18
Košutarica	S-KŠ	33.89
BI 1 (kvarcni pijesak)	S-BL1	0.00
BI 2 (kvarcni pijesak)	S-BL2	0.00

Tablica 6. Vrijednosti EC50 za uzorke vode dobivene iz sigmoidalne standardne krivulje E2.

LOKACIJA	OZNAKA	EC50
Otok Samoborski	OS1	38.38
Oborovo	OB	24.58
Sisak Crnac	SC	26.22
Košutarica	KŠ	23.50
ZOV - SE	ZSE	5.82
ZOV - PE	ZPE	1.56
Otok Samoborski - prelim. uz.	OS2	27.50
BI postupka (200 ml MeOH)	BL	0.00

c. Izračunati estradiolski ekvivalenti (E2Eq)

Dobivene podatke potrebno je staviti u kontekst mjerljivog odnosa, u ovom slučaju s E2, te estrogene potencijal uzoraka potom izraziti u estradiolskim ekvivalentima (E2Eq). Za uzorke sedimenta kao ng/g (Tablica 7.), a za uzorke površinske vode izrazit ćemo ga kao ng/L (Tablica 8.).

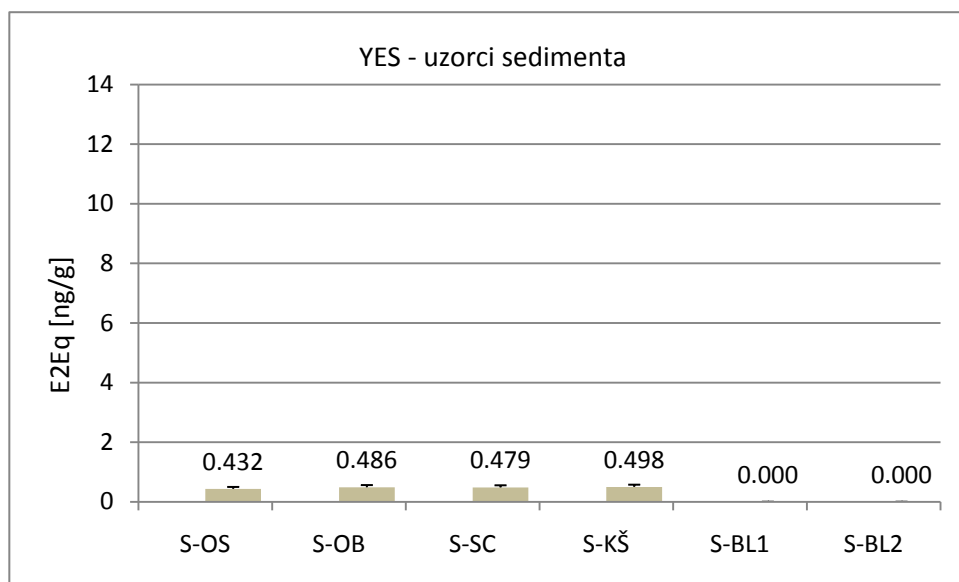
Tablica 7. Dobivene vrijednosti estradiolskih ekvivalenata za uzorke sedimenta.

LOKACIJA	OZNAKA	EEQ ng/g
Otok Samoborski	S-OS	0.432
Oborovo	S-OB	0.486
Sisak Crnac	S-SC	0.479
Košutarica	S-KŠ	0.498
Bl 1 (kvarcni pijesak)	S-BL1	0.000
Bl 2 (kvarcni pijesak)	S-BL2	0.000

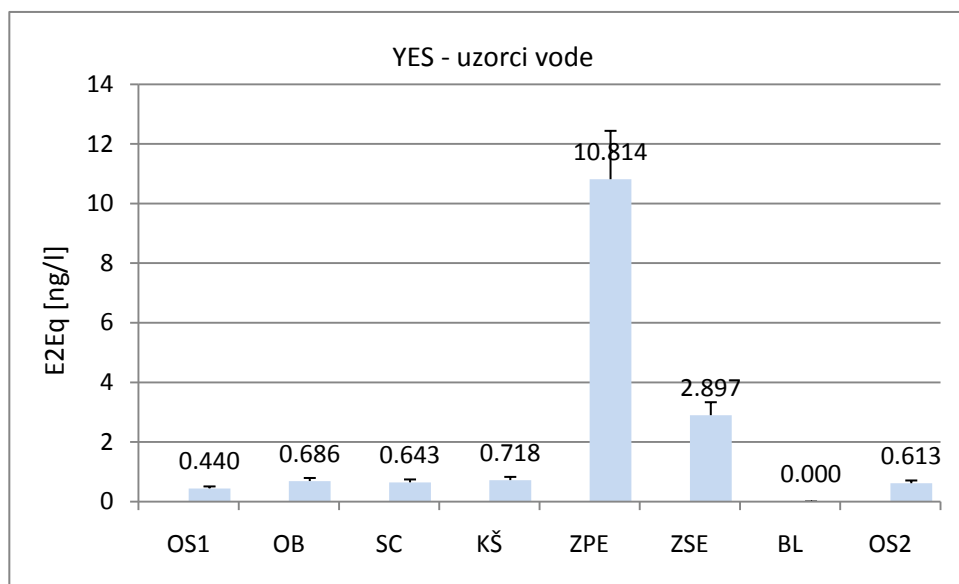
Tablica 8. Vrijednosti estradiolskih ekvivalenata za uzorke vode.

LOKACIJA	OZNAKA	EEQ ng/l
Otok Samoborski	OS1	0.440
Oborovo	OB	0.686
Sisak Crnac	SC	0.643
Košutarica	KŠ	0.718
ZOV - SE	ZSE	2.897
ZOV - PE	ZPE	10.814
Otok Samoborski prem. uzorak	OS2	0.613
Kontrola (200 ml MeOH)	BL	0.000

Rezultati su pokazali da je E2Eq za uzorke sedimenta prilično ujednačena, te rangiraju Savu u umjereno onečišćen vodotok, s estrogenim potencijalom između 0.2 i 0.4 ng/g E2Eq (Slika 12.). Rezultati površinske vode, premda nešto viši od uzoraka sedimenta, također potvrđuju Savu kao umjereno onečišćenu rijeku (izmjerene vrijednosti od 0.3 do 0.65 ng/l E2Eq; Slika 13.). Uzorak KŠ pokazuje nešto više vrijednosti E2Eq od lokacije SC, što je neočekivano, s obzirom da je Sisak industrijska zona. Međutim, lokacija KŠ nalazi se nedaleko od ušća Save s Unom, stoga postoji mogućnost da tim malim razlikama E2Eq doprinosi rijeka Una, odnosno onečišćenje iz susjedne Bosne i Hercegovine.

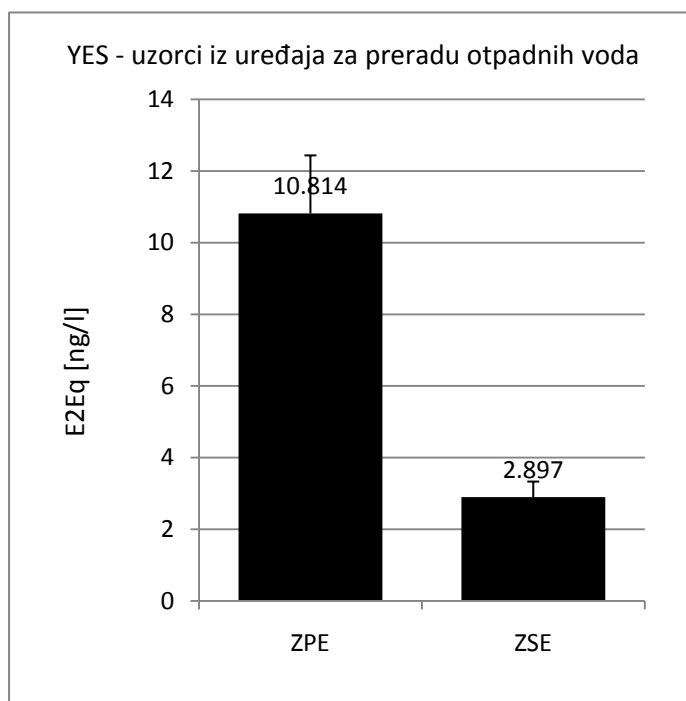


Slika 12. Vrijednosti E2Eq uzoraka sedimenta (OS – Otok Samoborski, OB – Oborovo, SC – Sisak Crnac, KŠ – Košutarica, BL1 i BL2 su kontrole).

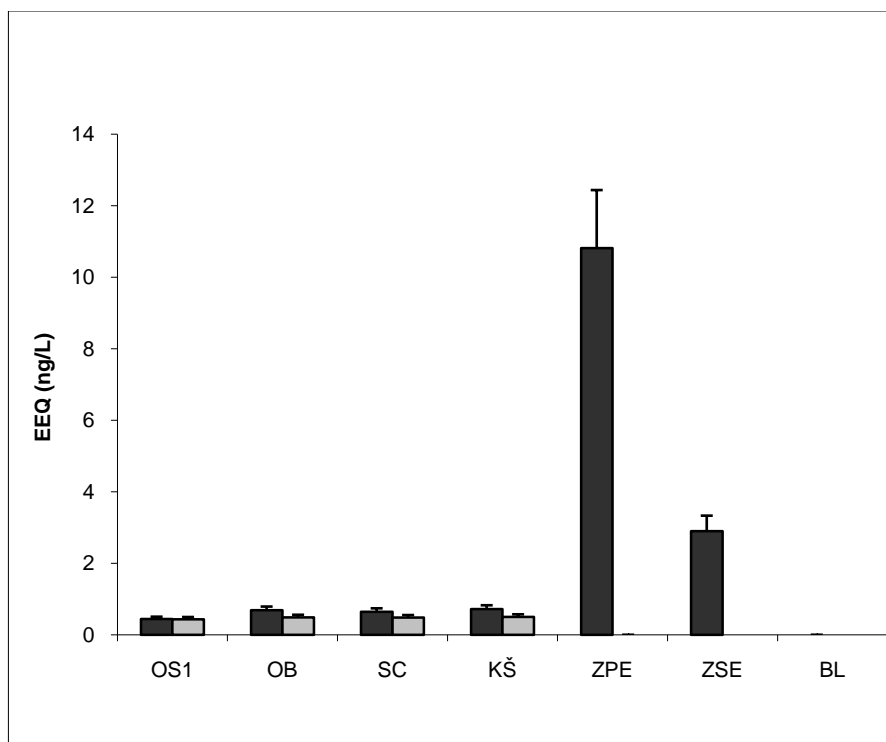


Slika 13. Vrijednosti E2Eq uzoraka vode (OS1– Otok Samoborski, OB – Oborovo, SC – Sisak Crnac, KŠ – Košutarica, ZSE- sekundarni ispust, ZPE – primarni ispust, BL – kontrola, OS2 – preliminarni uzorak Otok Samoborski).

Pravu sliku potrebe za suvremenim pročišćavanjem otpadnih voda daje estrogini potencijal 24-satnog, kompozitnog uzorka primarnog ispusta (ZPE) pročištača otpadnih voda grada Zagreba. Koncentrirani uzorak bio je za oko 20 puta opterećeniji ksenoestrogenima od onog OB, a vjerojatno i toksikantima, s obzirom da je u prvoj koloni s uzorcima izostao odgovor uslijed toksičnog djelovanja uzorka na kvasac. Rezultati naših mjerenja ukazuju da uzorak primarnog ispusta ima estrogini potencijal viši od 10 ng/l E2Eq (Slika 14.), što se u usporedbi s literaturnim saznanjima svakako smatra visokim estrogenim potencijalom. Pri tome je važno primijetiti da obradom primarnih otpadnih voda estrogini potencijal pada 70%, rezultirajući vrijednostima od 2.75 ng/l E2Eq izmjerenima za uzorak sekundarnog ispusta (ZSE) otpadnih voda (Slika 14.)



Slika 14. Vrijednosti E2Eq uzoraka iz uređaja za preradu otpadnih voda. Vidljivo je da uređaj efikasno odstranjuje spojeve s estrogenim potencijalom te da je nakon drugog koraka pročišćavanja vrijednost E2Eq manja za oko 70% (ZPE – primarni ispust, ZSE- sekundarni ispust).



Slika 15. Usporedba estrogenosti uzoraka vode (crni stupići) i sedimenta (sivi stupići). Vidljivo je da nema većih odstupanja niti naglih skokova osim onima u uređaju za obradu otpadnih voda (OS1– Otok Samoborski, OB – Oborovo, SC – Sisak Crnac, KŠ – Košutarica, ZPE – primarni ispust, ZSE- sekundarni ispust, BL – kontrola).

5. RASPRAVA

U uvodu je bilo više riječi o potrebi očuvanja i zaštite rijeke Save zbog ekološkog, gospodarskog, regionalnog i prometnog položaja. Nekoliko međunarodnih inicijativa (*Stability Pact Sava River Basin Initiative* – ISRBC, 2001; UNDP/GEF projekt 2002; *Assesement of Hazardous chemical contamination in the Sava River basin*, 2008) i nacionalni projekti (CARDS, 2003; SARIB, 2004), ukazuju da je prepoznata geostrateška važnost Save, te da postoje realna nastojanja i interes za upravljanje Savom kao važnim resursom. Kako bi upravljanje bilo održivo, neophodno je stvaranje sustava nadzora i procjene rizika od potencijalnih štetnih učinaka ljudskog djelovanja.

Kao odgovor na potrebu nadzora i procjene rizika uspostavljena je međunarodna suradnja između instituta IRB i NIVA-e, koja pruža znanstveni oslonac za identifikaciju potencijalno opasnih kemijskih spojeva u rijeci Savi i njenim pritocima. Pri tome se koristi suvremeni EDA pristup, koji ima za cilj odabir i korištenje poznatih, ali i razvoj novih metoda koji će biti specifične i pouzdane za Savu i njene pritoke. EDA protokoli, sinergijom bioloških i kemijskih metoda, ciljano identificiraju kemijske spojeve koji u biološkim testovima izazivaju najznačajnije odgovore, te tako omogućuju vjerodostojniju procjenu štetnosti za okoliš nego same kemijske analize. Bitno je napomenuti da kemijska analiza neizostavno upotpunjuje rezultate biotestova, otkrivajući kemijsku strukturu i tip kemijskih zagađivala, što je preduvjet za učinkovitu obradu otpadnih voda.

U sklopu projekta *Assessment of Hazardous chemical contamination in the Sava River basin*, prema EDA protokolu, odabrano je 6 tipova ekotoksikoloških testova kojima će se preliminarno analizirati stanje u rijeci Savi i efikasnost središnjeg uređaja za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba. Odabrani su sljedeći testovi:

- Test kronične toksičnosti na slatkovodnoj jednostaničnoj algi *Selenastrum capricornutum*
- Amest–test za procjenu genotoksičnih spojeva
- Testovi za procjenu indukcije i inhibicije puteva stanične detoksikacije

- Test na aktivnost glutathion S-transferaze u PLHC-1 staničnoj liniji ribljih hepatoma stanica
- EROD-test, u PLHC-1 stanicama mjeri se aktivnost etoksiresorufin O-deetilaze
- MXR-test (eng. – *multixenobiotic* resistance), multiksenobiotska otpornost
- YES test (eng. – *Yeast Estrogen Screen*), test na prisutstvo ksenoestrogenih spojeva

Tema ovog diplomskog rada, izrađenog u okviru navedenog projekta, bila je određivanje estrogenog potencijala uzoraka sedimenta, površinske i otpadne vode korištenjem biotesta YES. Dobiveni rezultati po prvi puta su ukazali na estrogeni potencijal rijeke Save, te relevantni doprinos otpadnih voda grada Zagreba. Ne manje važno, metoda mjerenja estrogenog potencijala YES biotestom prvi puta je primijenjena za mjerenje estrogenosti okolišnih uzoraka nekog vodotoka u Hrvatskoj. U skladu s iskustvima drugih istraživačkih skupina u svijetu i našim očekivanjima, YES biotest se i ovom prilikom pokazao kao osjetljiv, pouzdan i okolišno relevantan biotest.

Kao što smo napomenuli u poglavlju Rezultati, estrogeni potencijal uzoraka sedimenata i površinske vode rijeke Save prilično je ujednačen i prema razini odgovora predstavlja umjereni estrogeni potencijal niži od 1 ng/l ili g E2Eq (Tablice 7. i 8., Slika 15.). Donekle neočekivanim možemo nazvati viši estrogeni potencijal izmjeren za lokaciju KŠ u odnosu na lokaciju Sisak Crnac neposredno nizvodno od grada Siska, no vjerujemo da se ovakav rezultat može pripisati dodatnom (iako ne i značajno višem) unosu estrogenih spojeva rijekom Unom iz područja susjedne Bosne i Hercegovine. Dokazivanje ove hipoteze svakako zahtijeva analizu uzoraka iz rijeke Une, što nadilazi okvire ovog diplomskog rada.

Najznačajniji rezultat ovog rada svakako je identifikacija estrogenog potencijala otpadnih voda grada Zagreba. Kao što se može vidjeti na slici 15., izmjereni učinak uzorka primarnog ispusta otpadnih voda uređaja za pročišćavanje grada Zagreba daleko je viši od svih drugih uzoraka. Štoviše, izmjerene vrijednosti premašuju 10 ng/l E2Eq, ukazujući da se prema relevantnim međunarodnim iskustvima i otpadne vode grada Zagreba mogu kvalificirati visokoestrogenima, kao što je to slučaj s brojnim drugim velikim gradovima u EU (Stachel i sur., 2003.). I kao što je

to slučaj s drugim visokourbaniziranim sredinama, nema sumnje da je estrogenski potencijal zagrebačke otpadne vode prije svega rezultat visoke gustoće naseljenosti koja rezultira korištenjem estrogenskih spojeva, kako u kućanstvima (kontraceptivi, sredstva za osobnu higijenu), tako i industrijskim aktivnostima koja kao popratnu pojavu imaju ispuštanje kemikalija s dokazanim estrogenskim učinkom (boje, plastikanti, sredstva za zaštitu, agrokemikalije i sl.). Međutim, naši rezultati također ukazuju da je relativno novi, suvremeni zagrebački uređaj za pročišćavanje otpadnih voda dosta učinkovit u uklanjanju estrogenskih spojeva. Naime, prolaskom kroz uređaj estrogenski potencijal otpadne vode pada za nekih 70% (Slika 14.), što je međutim još uvijek značajno više od vrijednosti izmjerene za bilo koji drugi uzorak vode ili sedimenta. Nadalje, izmjereni estrogenski potencijal sekundarnog ispusta značajno opada uslijed razrjeđenja otpadne vode grada Zagreba rijekom Savom, i to razrjeđenje je očigledno dovoljno da bi estrogenski potencijal nizvodno sakupljenih uzoraka vode i sedimenta bio unutar granica okolišno prihvatljive umjerene estrogenosti (ispod 1 ng/l ili ng/g E2Eq).

Prema tome, suvremeno pročišćavanje otpadnih voda, osobito onih visokourbaniziranih sredina, apsolutni je prioritet i kada je u pitanju uklanjanje ksenostrogena. U tehnološkom smislu rješenja očigledno postoje. Naravno, pored odgovarajuće tehnologije pročišćavanja neizostavni dio uspješne regulative je i monitoring, a rezultati ovog diplomskog rada jasno ukazuju da je YES odgovarajuća metoda za mjerenje estrogenosti složenih okolišnih uzoraka.

Premda suradnja IRB-a i NIVA-e putem EDA pruža znanstveni okvir nadzora, identifikacije i procjene rizika kemijskog onečišćenja potencijalno opasnim spojevima, izostaju jasne i suvremene smjernice i kriteriji kategorizacije zagađenosti u zakonskoj regulativi. Među postojećim zakonskim pravilnicima, koji se primjenjuju u razvijenijim zemljama zapadne Europe i SAD-a postoje velike razlike, stoga vjerujemo da će rezultati ovog i sličnih projekata doprinijeti stvaranju novih pravilnika i kategorizacije potencijalno opasnih kemijskih zagađivala u okolišu, a u konačnici pružiti preduvjete za zaštitu okoliša i održivo upravljanje vodenih tokova, te kvalitetnu obradu otpadnih voda.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata ekotoksikološkog testa YES, učinjenog na uzorcima sedimenta i površinske vode rijeke Save u svrhu određivanja estrogenog potencijala, može se zaključiti sljedeće:

1. U svim uzorcima vode i sedimenta rijeke Save zabilježeno je prisustvo spojeva s estrogenim potencijalom, s tim da estrogeni potencijal, izražen u estradiolskim ekvivalentima, upućuje u umjerenu opterećenost rijeke Save ksenoestrogenima
2. Potvrđena je hipoteza o tome da Zagreb i Sisak predstavljaju ključni doprinos opterećenosti rijeke Save estrogenim spojevima
3. Lokacija KŠ, nedaleko od Jasenovca i ušća rijeke Une u Savu pokazuje gotovo jednaku opterećenost ksenoestrogenima kao i Sisak Crnac, te nešto manju od lokacije Oborovo, a između lokacija OB, SC i KŠ ne postoji gradijent pada u estradiolskim ekvivalentima
4. Uzorak primarnog ispusta, ZPE kao što je i očekivano, pokazao je iznimno visoku vrijednost estradiolskog ekvivalenta
5. Primarnom obradom otpadnih voda estrogeni potencijal otpadne vode pada za dvije trećine u odnosu na primarni efluent (ZPE), ukazujući na nužnost uvođenja suvremene tehnologije obrade otpadnih voda i u drugim gradovima u Hrvatskoj.

7. LITERATURA

- Barceló, D. 2007. Emerging contaminants in Europe: Why we should monitor them?: 2nd EMCO workshop on emerging contaminants in wastewaters: monitoring tools and treatment technologies. Beograd, Srbija.
- Beresford, N., Routledge, E.J., Harris, C.A., Sumpter, J.P. 2000. Issues arising when interpreting results from an in vitro assay for estrogenic activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 162, 22-33.
- Bern H.A., Blair P., Brasseur S., Colborn T., Cunha G.R., Davis W., Dohler K.D., Fox G., Fry M., Gray E., Green R., Hines M., Kubiak T.J., McLachlan J., Myers J.P., Peterson R.E., Reijnders P.J.H., Soto A., Van Der Kraak G., vom Saal F., Whitten P. Statement from the Work Session on Chemically-Induced Alterations in Sexual Development: The Wildlife/Human Connection. July 1992, Wingspread Conference Center, Racine, Wisconsin, USA. Dostupno na:
http://www.endocrinedisruption.com/files/wingspread_consensus_statement.pdf
- Bošnjir J., Puntarić D., Klarić M., Šmit Z., 2004. Polychlorinated Biphenyls in Freshwater fish from the Zagreb area. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 56, 303-309.
- Chapman, P.M. 2006. Emerging substances – emerging problems? *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1445-1447.
- Colborn T., Dumanoski D., Myers J.P. (1996) *Our stolen future* Dutton, Peguin Books, New York.
- De Boever, P., Demaré, W., Vanderperren, E., Cooreman, K., Bossier, P., Verstraete, W. 2001. Optimization of a yeast estrogen screen and its applicability to study the release of estrogenic isoflavones from a soygerm powder. *Environ. Health Perspect.* 109, 691–697.
- Guillette L. J. Jr., Pickford D. B, Crain D. A., Rooney A. A., Percival H. F. 1995. Reduction in Penis Size and Plasma Testosterone Concentrations in Juvenile Alligators Living in a Contaminated Environment. *Endocrinol.* 101, 32-42.
- Harris, C.A., Henttu, P., Parker, M.G., Sumpter, J.P. 1997. The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ. Health Perspect.* 105, 802-811.
- ISRBC, Analiza rijeke Save, Sažetak, 2010. Dostupno na:
http://www.savacommission.org/dms/docs/dokumenti/documents_publications/publications/sava_river_basin_analysis_-_summary/sava_booklet_hrv.pdf
- ISRBC, International Sava River Basin Commission. 2001. Dostupno na:
<http://www.savacommission.org/>.

- Klotz, D.M., Beckman, B.S., Hill, S.M., McLachlan, J.A., Walters, M.R., Arnold, S.F. 1996. Identification of environmental chemicals with estrogenic activity using a combination of in vitro assays. *Environ. Health Perspect.* 104, 1084-1089.
- Laws S. C., Carey S. A., Ferrell J. M., Bodman G. J., Cooper R. L., 1999. Estrogenic Activity of Octylphenol, Nonylphenol, Bisphenol A and Methoxychlor in Rats. *Toxicol. Sci.* 54, 154-167.
- López de Alda M., Barceló D., 2001. Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters. *Fresen. J. Anal. Chem.* 371, 437-447.
- Markey C. M., Rubin B. S., Soto A. M., Sonnenschein C., 2002. Endocrine disruptors: from Wingspread to environmental developmental biology. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* 83, 235-244
- Matsuoka, S., Kikuchi, M., Kimura, S., Kurokawa, Y., Kawai, S. 2005. Determination of Estrogenic Substances in the Water of Muko River Using in Vitro Assays, and the Degradation of Natural Estrogens by Aquatic Bacteria. *J. Health Sci.* 51, 178-184.
- Miksicek R.J, 1993. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Molecular Pharmacology.* 44, 37-43.
- Milković Ž., 2010. Sava River Basin-inland waterway regulatory framework and infrastructure. *Pomorski zbornik.* 46, 51-60.
- NATO SfP Sava River, Assessment of hazardous chemical contamination in the Sava River basin. 2008. NATO Science for Piece projekt, dostupno na: <http://www.irb.hr/nato-savariver/>.
- Nilsson, R. 2000. Endocrine modulators in the food chain and environment. *Toxicol. Pathol.* 28, 420-431.
- Oakes E. H. (2007) *Encyclopedia of world scientists*, Volume 1, Infobase publishing, New York.
- Panzica G. C., Viglietti-Panzica C., Mura E., Quinn M. J., Lavoie E., Palanza P., Ottinger M. A., 2007. Effects of xenoestrogens on the differentiation of behaviorally- relevant neural circuits. *Front. Neuroendocrinol.* 28, 179-200
- Routledge, E.J. and Sumpter, J.P. 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 241-248.
- Rutishauser B. V., Comparative application of a recombinant yeast estrogen screen and mechanisms of suppressed activity. 2004. Diss Eth No. 15355, University of Zürich.

- Stachel B., Heemken, O. P., Reincke, H., Theobald N. 2001. The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea. *Chemosphere* 45, 249–259.
- Semenza J. C., Tolbert P. E., Rubin C. H., Guillette Jr L. J., Jackson R. J., 1997. Reproductive Toxins and Alligator Abnormalities at Lake Apopka, Florida. *Environmental Health Perspectives*. 105, 1030-1032.
- Turner J. V., Agatonovic-Kustrin S., Glass B.D. 2007. Molecular aspects of phytoestrogen selective binding at estrogen receptors. *J. Pharm. Sci.* 96, 1879-1885.
- Vandenberg L. N., Maffini M. V., Sonnenschein C., Rubin B.S., and Soto A. M. 2008. Bisphenol-A and the Great Divide: A Review of Controversies in the Field of Endocrine Disruption. *Endocrine Reviews*. 30, 75-95.
- Wynne-Edwards K. E., 2001. Evolutionary Biology of Plant Defenses against Herbivory and Their Predictive Implications for Endocrine Disruptor Susceptibility in Vertebrates. *Environ. Health Perspect.* 109, 443-448.
- Yamasaki Km., Sawaki M., Takatsuki M., 2000. Immature Rat Uterotrophic Assay of Bisphenol A. *Environ. Health Perspect.* 108, 1147-1150.